

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**“IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA
BASADA EN LA COMBINACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE
PCR Y TP-PCR PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR
DE LA DISTROFIA MIOTÓNICA TIPO 1 EN EL
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLÓGICAS
EN EL AÑO 2014”**

TESIS

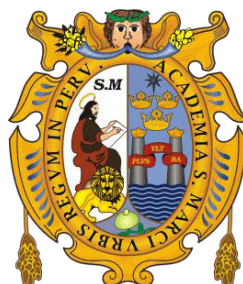
Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo

AUTOR

Ana Karina Milla Neyra

Lima-Perú

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA BASADA EN
LA COMBINACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE PCR Y TP-PCR
PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA DISTROFIA
MIOTÓNICA TIPO 1 EN EL INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS NEUROLÓGICAS EN EL AÑO 2014**

Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo

Bach. Ana Karina Milla Neyra

Asesor Externo: Méd. Cir. Mario R. Cornejo Olivas

Asesor interno: Mg. Ricardo Descailleaux Dulanto

Lima-Perú

2015

*A mi familia: Anita, Jesús y Raúl por ser mi
soporte y mi razón para seguir creciendo.*

*A aquellos que ya no están pero que nunca
olvido: Maura, Nelson y Asunción.*

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por apoyarme incondicionalmente, por siempre darme palabras de aliento en los momentos más difíciles y por acompañarme en mis aventuras. A mi padre, por iluminar mi camino con sus palabras. A mi madre, por ser mi cómplice. A Raulito, por ser mi mejor amigo y confidente.

A todos los investigadores del Centro de investigación Básica en Neurogenética, por formarme intelectualmente, por hacerme sentir en familia y apostar por mí. En especial, a Mario Cornejo, Miguel Inca, Victoria Marca y Olimpio Ortega, por todas las risas y lágrimas que enfrentamos durante la realización de este trabajo.

A los profesores Jaime Descailleaux y Margarita Velásquez, por brindarme la oportunidad de desarrollarme en Genética Humana.

A Estefanía, por todas las cosas que compartimos en la universidad y que seguimos compartiendo aunque no esté cerca.

ABREVIATURAS

5' UTR	5' Untranslated región (Región 5' no codificante).
DNA	Desoxiribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico).
RNA	Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico).
mRNA	Messenger RNA (ARN mensajero).
APS	Ammonium persulfate (Persulfato de amonio).
CELF	CUG-BP and ETR-3 like factors (factores tipo CUG-BP y ETR-3).
CUG-BP	CUG Binding Protein (proteína de unión a regiones con repeticiones CUG)
DMPK	Dystrophia myotonica protein kinase (Proteína quinasa de la Distrofia miotónica)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMWD	Dystrophia Myotonica-Containing WD Repeat Motif Protein (proteína DMR-N9).
dNTP	Desoxiribonucleótidos trifosfato
ETR3	Elav-type RNA-binding protein (proteína de unión a regiones con repeticiones CUG-2)
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MBNL	Muscle-blind like (Proteína similar a Muscle-blind)
PCR	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
SIX5	Sine oculis homeobox (homeodominio asociado al locus DM)
TBE	Tris/Borato/EDTA
TEMED	Tetrametil etileno diamino
Tris	Tris hidroximetil aminometano
TP-PCR	Triplet repeat primed polymerase chain reaction

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Aspectos generales de la DM1	3
2.2. Características clínicas de la DM1	4
2.3. Genética de la DM1	5
2.4. Fisiopatología molecular de la DM1	8
2.5. Diagnóstico de la DM1	11
2.5.1. Diagnóstico clínico de la DM1	11
2.5.2. Diagnóstico molecular de la DM1	11
2.5.3. Diagnóstico diferencial de la DM1	15
2.6. Importancia del diagnóstico molecular de la DM1 en el Perú	16
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIAL Y MÉTODOS	19
4.1. Tipo y diseño de estudio	19
4.2. Población	19
4.3. Materiales	19
4.4. Metodología	21
4.4.1. Optimización de la técnica de genotipificación del gen <i>DMPK</i>	21
4.4.2. Genotipificación del gen <i>DMPK</i> en pacientes con diagnóstico clínico de DM1 en el CIBN-INCN.	26

4.5.	Aspectos éticos	26
5.	RESULTADOS	27
5.1.	Optimización de la técnica de genotipificación del microsatélite CTG del gen <i>DMPK</i> .	27
5.1.1.	Estandarización de la técnica de PCR convencional para la genotipificación del alelo normal del gen <i>DMPK</i> .	27
5.1.2.	Estandarización de la técnica de TP-PCR para genotipificar el alelo expandido del gen <i>DMPK</i> .	27
5.2.	Genotipificación del gen <i>DMPK</i> en pacientes con diagnóstico clínico de DM1 en el CIBN-INCN.	35
5.2.1.	Distribución del alelo normal en las muestras estudiadas.	38
5.2.2.	Frecuencia de DM1 con confirmación molecular en la muestra estudiada.	38
6.	DISCUSIÓN	41
7.	CONCLUSIONES	46
8.	RECOMENDACIONES	47
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
10.	ANEXOS	57

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Correlación genotipo-fenotipo observado en la DM1.	7
Tabla 2. Genotipos de las muestras de ADN seleccionadas para la optimización de la genotipificación del gen <i>DMPK</i> .	22
Tabla 3. Muestras de ADN con genotipo conocido seleccionadas para la optimización de la técnica de genotipificación del microsatélite CTG del gen <i>DMPK</i> .	27
Tabla 4. Variaciones al protocolo de amplificación por PCR convencional para genotipificar el alelo normal del gen <i>DMPK</i> .	29
Tabla 5. Variaciones al protocolo de amplificación por TP-PCR para la detección del alelo en rango patológico del gen <i>DMPK</i> .	34
Tabla 6. Características de los casos DM1 positivos y negativos.	39
Tabla 7. Características clínicas de los seis individuos con resultado negativo para DM1.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos con el protocolo inicial de PCR convencional para genotipificar el alelo normal del gen <i>DMPK</i> .	28
Figura 2. Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos con el protocolo optimizado de PCR convencional para genotipificar el alelo normal del gen <i>DMPK</i> .	31
Figura 3. Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos con el protocolo optimizado de PCR convencional usando marcadores seleccionados para genotipificar los alelos normales del gen <i>DMPK</i> .	32
Figura 4. Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos con protocolo inicial de TP-PCR para discriminar el microsatélite CTG expandido en el gen <i>DMPK</i> .	33
Figura 5. Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos con el protocolo optimizado de TP-PCR para discriminar el microsatélite CTG expandido en el gen <i>DMPK</i> .	35
Figura 6. Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos por PCR convencional para genotipificar el alelo normal del microsatélite CTG en el gen <i>DMPK</i> .	36
Figura 7. Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos por TP-PCR para detectar el rango patológico del gen <i>DMPK</i> utilizando los controles seleccionados.	37
Figura 8. Distribución alélica del microsatélite CTG del gen <i>DMPK</i> no afectado de 72 casos analizados.	38

RESUMEN

Introducción. La distrofia miotónica tipo 1 (DM1) es un desorden sistémico autosómico dominante ocasionado por la expansión anormal del triplete CTG en la región 3' UTR del gen *DMPK* (19q13.3). El diagnóstico definitivo de la DM1 se realiza mediante métodos moleculares, siendo el southern blot el estándar de oro. En el Perú, hasta el momento, ninguna institución pública o privada realiza el diagnóstico molecular de DM1.

Objetivo. Implementar una metodología basada en la combinación de las técnicas de PCR y TP-PCR para el diagnóstico molecular de la distrofia miotónica tipo 1 en el Centro de Investigación Básica en Neurogenética (CIBN) en el Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN). **Métodos.** Utilizando 6 muestras de ADN con genotipo conocido se estandarizó el protocolo de PCR convencional para genotificación de alelos normales así como el protocolo TP-PCR para la detección del alelo expandido del gen *DMPK*. Con el protocolo optimizado, se genotipificaron 72 muestras de ADN de individuos con diagnóstico clínico de DM1 atendidos en el CIBN del INCN. **Resultados.** Este estudio implementó una metodología basada en la combinación de las técnicas de PCR y TP-PCR para el diagnóstico molecular de la distrofia miotónica tipo 1, así como la genotipificación de la región polimórfica del microsatélite CTG del gen *DMPK* en pacientes con diagnóstico clínico de DM1 del CIBN-INCN. Se confirmó el diagnóstico de DM1 en 66 casos (91.6%). Cuarenta y cuatro casos (66.7%) eran originarios de Lima. La edad de inicio de los síntomas fue de 25.8 ± 13.4 años. **Conclusión:** La estandarización del protocolo combinado de PCR y TP-PCR permitió la genotipificación del gen *DMPK*. Se confirmó el diagnóstico de DM1 en 66 de 72 pacientes estudiados.

Palabras clave: Distrofia miotónica tipo 1, *DMPK*, TP-PCR, PCR, microsatélite

ABSTRACT

Introduction. Myotonic dystrophy type 1 is a dominantly inherited disorder, caused by a microsatellite expansion of the 3' UTR in the *DMPK* gene (19q13.3). Genetic testing is the definitive diagnosis for DM1, Southern blot is the gold standard. In Peru, at least, any public or private institution has available a molecular diagnosis to DM1. **Objective.** To implement a methodology based on PCR and TP-PCR combination to molecular diagnosis of myotonic dystrophy type 1 in CIBN-INCN. **Methods.** Using 6 DNA samples with known genotype, it was standardized a PCR protocol to genotype normal alleles as well as a TP-PCR protocol to detect expanded alleles of *DMPK* gene. 72 DNA samples of individuals with clinical diagnosis of DM1 in CIBN-INCN. **Results.** This study implemented a methodology based on the combination of PCR and TP-PCR for molecular diagnosis of DM1 and genotyping of polymorphic microsatellite CTG region of *DMPK* gene in patients with clinical diagnosis of DM1. DM1 diagnosis was confirmed in 66 cases (91.6%). Forty-four cases (66.7%) were from Lima. The age of onset of symptoms was 25.8 ± 13.4 years. **Conclusion:** The protocol based on PCR and TP-PCR allowed *DMPK* gene. DM1 diagnosis was confirmed in 66 of 72 patients studied.

Palabras clave: Myotonic dystrophy type 1, *DMPK*, TP-PCR, PCR, microsatellite

1. INTRODUCCION

La distrofia miotónica tipo 1 (DM1) es un desorden sistémico autosómico dominante, ocasionado por la expansión anormal del triplete CTG (Citosina-Timina-Guanina) en la región 3' no codificante del gen *DMPK* ubicado en el cromosoma 19q13.3 (Brook et al., 1992). Debido a que otras enfermedades neuromusculares poseen características clínicas similares a las presentes en la DM1, el diagnóstico definitivo de esta enfermedad se realiza mediante métodos moleculares (IDMC, 2000).

La técnica estándar de oro para el diagnóstico molecular de la DM1 es el *Southern blot*, debido a que permite la detección de alelos con grandes expansiones del triplete CTG en el gen *DMPK*; sin embargo, plantea dificultades para la detección de alelos con pequeñas expansiones (Prior, 2009). Dado el alto grado de laboriosidad, el alto costo y las condiciones requeridas para la implementación de esta técnica (Harvey & Soundy, 2005), se han desarrollado algunas metodologías alternativas actualmente validadas para el diagnóstico molecular de la DM1.

El diagnóstico molecular para DM1 basado en la reacción en cadena de la polimerasa convencional (o PCR, por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) resulta menos costosa y más rápida que la técnica estándar de oro; sin embargo, solamente permite la detección de alelos de hasta 125 repeticiones CTG (Warner et al., 1996), por tanto es necesario el uso de técnicas complementarias como triplet primed PCR (TP-PCR) para la detección de grandes expansiones. El uso combinado de las técnicas de PCR y TP-PCR permite la detección cuantitativa de alelos normales y pre-mutados y la detección cualitativa de los alelos con grandes expansiones sin necesidad de emplear técnicas de mayor complejidad como el *Southern blot* (Singh et al., 2014).

En Latinoamérica, sólo algunos países, como Brasil (Rede Neurogenetica), Costa Rica (Universidad de Costa Rica) y Argentina (Laboratorio de diagnóstico molecular privado),

cuentan con diagnóstico genético para la DM1. En el Perú, el Centro de Investigación Básica en Neurogenética (CIBN) del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN) es el único centro de referencia nacional para la atención de enfermedades neurodegenerativas hereditarias, siendo la DM1 la segunda causa más frecuente de consulta (CIBN, 2014). El diagnóstico de esta patología está basado únicamente en la evaluación clínica; dificultando y limitando la calidad de atención a las personas afectadas por DM1, así como a sus familiares, posiblemente afectados o que desarrollarán la enfermedad en el futuro.

La implementación de un protocolo molecular para detectar alelos con grandes expansiones en el microsatélite del gen *DMPK*, comprobará el diagnóstico y pronóstico de los pacientes con distrofia miotónica, así como en el manejo de la aparición de los diversos cuadros clínicos. Este estudio propone la implementación de una metodología basada en la combinación de las técnicas de PCR y TP-PCR para el diagnóstico genético-molecular de la DM1 en el INCN.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Aspectos generales de la DM1

La distrofia miotónica tipo 1 (DM1; OMIM #160900) o enfermedad de Steinert es un desorden neuromuscular con efecto multisistémico, progresivo y pleiotrópico caracterizado por miotonía, atrofia y debilidad muscular, cataratas, anomalías cardíacas, hipogonadismo y desórdenes endocrinos (Romeo, 2012).

La DM1 es la forma más frecuente de distrofia en adultos (Romeo, 2012). La prevalencia de la distrofia miotónica tipo 1 varía ampliamente en diferentes poblaciones, desde 0.46 afectados por cada 100 000 habitantes en Taiwán, China (Hsiao et al., 2003) hasta 189 por cada 100 000 habitantes en Québec, Canadá (Yotova et al., 2005). En Europa, la prevalencia promedio es de 15 afectados por cada 100 000 habitantes (Mladenovic et al., 2006; Norwood et al., 2009; Siciliano et al., 2001), registrándose en Finlandia una prevalencia de 36 afectados por cada 100 000 individuos (Suominen et al., 2011). En oriente medio, se estima que existen 9.4 afectados por cada 100 000 habitantes en Israel, mientras que el pueblo judío yemenita muestra una alta frecuencia de individuos afectados por la enfermedad, de 47 por cada 100 000 pobladores (Segel et al., 2003). Por otro lado, la DM1 es extremadamente rara en la población africana y la presencia de una familia afectada puede deberse a un efecto fundador proveniente de alguna población europea (Goldman et al., 1996). La alta prevalencia de la enfermedad en Quebec, Canadá podría explicarse por un evento de efecto fundador al final del siglo XVII, coincidiendo con la colonización del virreinato de la Nueva Francia (Yotova et al., 2005). En Latinoamérica, no existen descripciones sobre la prevalencia de la distrofia miotónica del tipo 1, de modo que la prevalencia de la enfermedad no ha sido estimada en este grupo poblacional.

2.2. Características clínicas de la distrofia DM1

La DM1 posee una amplia variabilidad fenotípica por lo que ha sido clasificada en cuatro categorías por la edad de presentación de la enfermedad:

2.2.1. *Distrofia miotónica leve (>50 años)*: Puede ser asintomática o presentar los síntomas tardíamente. La característica clínica predominante es la presencia de cataratas, mientras que el desarrollo de miotonía y debilidad muscular es menos frecuente (De Die-Smulders, 2000). La alopecia restringida al área fronto-temporal es también un signo de la DM1 leve (Amorosi et al., 1999).

2.2.2. *Distrofia miotónica clásica (12-50 años)*: Se caracteriza por miotonía, debilidad muscular, cataratas; anomalías cardíacas, respiratorias, endocrinas y gonadales, así como hipersomnia (De Die-Smulders, 2000; Moxley et al., 1984; Pelargonio et al., 2002; De Swart et al., 2004). La debilidad muscular afecta los músculos faciales, ocasionando ptosis palpebral (descenso permanente del párpado superior), mandíbula floja, apertura involuntaria de la boca y debilidad en el paladar, la lengua y las cuerdas vocales (Whittaker et al., 2006). También afecta los músculos de la faringe ocasionando disfagia (Umemoto et al., 2007). La atrofia y la debilidad de los músculos del cuello son frecuentes, causando dificultad para levantar la cabeza. Si la afección implica los músculos del pecho, podría asociar insuficiencia respiratoria crónica. La debilidad y la atrofia afectan los músculos distales de las extremidades superiores, en particular, los dedos y las muñecas. En las extremidades inferiores ocasiona los pies caídos (Romeo, 2012). Las principales manifestaciones oculares son las cataratas subscapulares posteriores. A nivel cardíaco, la enfermedad afecta el ritmo cardíaco y la conducción causando dificultad para respirar, malestar, palpitaciones, síncope y, en casos graves, la muerte súbita (Pelargonio et al., 2002). En el sistema endocrino, los individuos afectados presentan hipersensibilidad a la insulina y

diabetes, los hombres afectados por la enfermedad a menudo sufren de atrofia testicular progresiva (Kim et al., 2012; Moxley et al., 1984).

2.2.3. *Distrofia miotónica juvenil (1-12 años)*: Los individuos afectados presentan miotonía, problemas cardíacos de inicio temprano y retraso psicomotor. Es notable el desarrollo de problemas psiquiátricos, tales como ansiedad, depresión y dificultad al integrarse en la sociedad (Douniol et al., 2012).

2.2.4. *Distrofia miotónica congénita (< 1 año)*: Presenta características clínicas distintas a la forma clásica de la enfermedad. Durante el embarazo, se observa polihidramnios y una reducción de los movimientos fetales normales (Harper, 1975). Al nacer, se evidencia debilidad generalizada grave, parálisis facial, hipotonía, compromiso respiratorio, retraso del desarrollo motor y, en algunos casos, se observa atrofia cerebral y dilatación ventricular (Reardon et al., 1993). Los niños afectados con este cuadro clínico presentan pies deformes, el labio superior en forma de V invertida, a causa de la debilidad facial, y encópresis fecal por atrofia del esfínter anal (Bellini et al., 2006; Rutherford et al., 1989). Se evidencia dificultad para el aprendizaje y retraso mental. Cabe resaltar que algunas de las características principales de la forma adulta, como la miotonía o las cataratas, se encuentran ausentes; aunque podrían desarrollarse a lo largo del crecimiento del individuo afectado (Harper, 1975). La causa de muerte más común se encuentra relacionada con problemas respiratorios y arritmias cardíacas (Reardon et al., 1993).

2.3. Genética de la DM1

La DM1 es un desorden autosómico dominante producido por la expansión del triplete CTG presente en la región 3'-UTR del gen *DMPK*, ubicado en el cromosoma 19q13.3 (Brook et al., 1992). Los individuos sanos presentan alelos con 5 a 34 repeticiones CTG. Los individuos afectados presentan más de 50 repeticiones CTG (IDMC, 2000), la forma leve de la enfermedad presenta entre 50 y 100 repeticiones (Harley et al., 1993),

mientras que las formas clásica y juvenil muestran repeticiones CTG mayores a 100 (Brook et al., 1992). La forma congénita puede presentar desde 500 repeticiones CTG, encontrándose repeticiones mayores a 2000 con mayor frecuencia (Tsiflidis et al., 1992). La edad de inicio y la severidad de la enfermedad muestran una marcada correlación con el tamaño de la expansión de la repetición CTG (Gennarelli et al., 1996). Las características fenotípicas presentes en cada forma de la enfermedad aparecen casi siempre en los individuos afectados debido a la alta penetrancia de la mutación (92%) (Shelbourne et al., 1992).

Encontramos cuatro tipos de alelos entre normales y patológicos que se encuentran relacionados con las características del desorden:

- 2.3.1. *Alelos normales*: Presentan de 5 a 34 repeticiones CTG. Presentan un patrón de segregación genética estable y no se encuentran relacionado con el desarrollo de la patología (Bird, 1993; IDMC, 2000).
- 2.3.2. *Alelos inestables no patológicos*: La longitud de estos alelos varía de 35 a 49 repeticiones. No se encuentran relacionados a la patología clínica, pero presentan inestabilidad genética, de modo que pueden transmitir un alelo expandido y patológico a la descendencia (fenómeno de anticipación genética), por esta razón son denominados alelos pre-mutantes (Brook et al., 1992; Cobo et al., 1996; IDMC, 2000).
- 2.3.3. *Alelos de penetrancia variable*: Varían desde 50 a 100 repeticiones CTG. Estos alelos presentan inestabilidad genética y se relacionan con el desarrollo de la forma leve de la enfermedad, aunque la expresividad de esta forma es variable entre los afectados (Brook et al., 1992; Harley et al., 1993; IDMC, 2000).
- 2.3.4. *Alelos de penetrancia completa*: Presentan más de 100 repeticiones CTG y son genéticamente inestables. Se asocia con las formas más críticas de la enfermedad: la forma clásica, juvenil y congénita (Brook et al., 1992; Harley et al., 1993; IDMC, 2000; Tsiflidis et al., 1992).

Las variaciones en la longitud de los microsatélites, debido a la delección o inserción de uno o más unidades de repetición, ocurren a causa de la "inestabilidad de los microsatélites". La expansión del triplete CTG en la DM1 presenta inestabilidad genética (Brook et al., 1992; Fu et al., 1992) y el grado de la inestabilidad se encuentra relacionada con la longitud del microsatélite, de modo que cuando la longitud de la expansión excede las 34 repeticiones, los alelos se tornan inestables; ver **Tabla 1** (Barceló et al., 1993; IDMC, 2000). La inestabilidad de las repeticiones de triplete CTG ocasionan la variación del número de repeticiones de un tejido a otro en un mismo individuo (heterogeneidad somática), así como de una generación a otra (inestabilidad intergeneracional) (Lavedan et al., 1993).

Tabla 1. Correlación genotipo-fenotipo observado en la DM1.

Fenotipo		Genotipo
Normal	Asintomático	A ₁ /A ₁
		A ₁ /A ₂
Leve	Asintomática / Cataratas	A ₁ /A ₃
Clásica	Miotonía, debilidad muscular, cataratas; anomalías cardíacas, respiratorias, endocrinas y gonadales.	A ₁ /A ₄
Juvenil	Miotonía, problemas cardíacos de inicio temprano y retardo mental.	
Congénita	Retardo mental, problemas respiratorios, parálisis facial, hipotonía y retraso del desarrollo motor.	A ₁ /A ₅

La tabla muestra la correlación genotipo-fenotipo observada en la DM1. A₁: Alelo normal y estable con 5 a 34 repeticiones CTG; A₂: Alelo premutado e inestable con 35 a 49 repeticiones CTG; A₃: Alelo de penetrancia variable e inestable con 50 a 100 repeticiones CTG; A₄: Alelo de penetrancia completa e inestable de 100 a 1000 repeticiones CTG; y A₅: Alelo de penetrancia completa e inestable con más de 1000 repeticiones CTG.

La heterogeneidad somática ocurre como consecuencia de la segregación mitótica inestable de las repeticiones CTG provocando diferentes longitudes de expansión en

distintos linajes tisulares, además el grado de heterogeneidad somática en un individuo afectado es proporcional al tamaño inicial de la expansión y a la edad del individuo, sugiriendo que la inestabilidad no se restringe al desarrollo embrionario sino que continúa durante la vida adulta, suceso que explicaría la progresividad de la enfermedad (Anvret et al., 1993; Wong et al., 1995). Por otro lado, la inestabilidad intergeneracional es evidenciada por la variación del tamaño de las repeticiones CTG al ser transmitida de una generación a otra y es dependiente del tamaño de la expansión (Lavedan et al., 1993). El incremento del número de las repeticiones a través de las generaciones, incrementa la severidad de la enfermedad y provoca la disminución de la edad de inicio del síndrome, fenómeno conocido como anticipación genética (Höweler et al., 1989). La inestabilidad meiótica ha sido asociada al sexo del progenitor que la transmite, observándose que el incremento de las repeticiones CTG de una generación a otra se da preferencialmente por transmisión materna, mientras que la transmisión paterna es usualmente asociada a eventos de contracción alélica y a una mayor inestabilidad en repeticiones de longitudes menores a 300 (Brunner et al., 1993; Lopez de Munain et al., 1995).

2.4. Fisiopatología molecular de la DM1

El mecanismo molecular de la patología ocasionada por la repetición del triplete CTG que da origen al carácter multisistémico de la DM1 no ha sido comprendido completamente (Ashizawa & Wells, 2006). Se han propuesto cuatro modelos para explicar el mecanismo de la patología molecular y celular de la enfermedad.

2.4.1. *Haploinsuficiencia de la proteína DMPK*: Este modelo propone que la expansión del triplete CTG afecta la expresión del alelo mutante ocasionando una reducción en los niveles de la proteína DMPK, una enzima serina-treonina quinasa cuyos sustratos se encuentran implicados en la regulación del proceso de excitación-contracción muscular (Mussini et al., 1999), la diferenciación y maduración de

los miocitos del músculo esquelético y cardíaco durante el desarrollo embrionario (Harmon et al., 2008). La evidencia sugiere que la expansión patológica del triplete CTG genera la disminución de la expresión de la proteína DMPK (Fu et al., 1993). La haploinsuficiencia de esta proteína es uno de los factores que contribuyen con el desarrollo de la enfermedad; sin embargo, no explica el carácter multisistémico de la patología.

2.4.2. *Haploinsuficiencia de la proteína SIX5 y genes adyacentes al gen DMPK*: Este modelo propone que la expansión de los triplete repetidos CTG induce la modificación local de la cromatina reprimiendo la transcripción de los genes vecinos de *DMPK* como *SIX5* y *DMWD* (Otten & Tapscott, 1995). El segmento conteniendo las repeticiones CTG del gen *DMPK* se encuentra colocalizado con la región 5' del promotor del gen *SIX5* y la expresión reducida de este gen ha sido relacionada con el desarrollo de cataratas (Winchester et al., 1999). Por otro lado, el gen *DMWD*, ubicado *corriente arriba* del gen *DMPK* y la reducción de la expresión de la proteína DMWD se encuentra involucrado en el desarrollo de atrofia testicular e infertilidad masculina en pacientes con DM1 (Jansen et al., 1995). Dada la evidencia, se encuentra claro que este modelo no explica la totalidad de la sintomatología de la patología.

2.4.3. *Ganancia de función tóxica del ARNm mutante de DMPK*: Los transcritos del gen *DMPK* con una expansión anormal del triplete CUG son retenidos en el núcleo celular y se acumulan formando una estructura denominada foco nuclear (Davis et al., 1997; Taneja et al., 1995). La expansión del triplete CUG en el ARNm mutante promueve la formación de bucles metaestables de doble cadena de ARN, los cuales capturan proteínas de unión a ARN involucradas en el proceso de transcripción de otros genes (Michalowski et al., 1999; Napierala & Krzyzosiak, 1997). Se han descrito dos familias de proteínas de unión a CUG implicadas en la patogénesis de la DM1: MBNL y CUG-BP. La familia MBNL es un grupo de proteínas con dedos de zinc implicadas en la regulación del

empalme alternativo tejido-específico y son expresadas en el corazón, cerebro, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón y páncreas (Fardaei et al., 2002). Se ha demostrado que las tres proteínas pertenecientes a la familia MBNL: MBNL1 (*musclebind-like 1*), MBNL2 (*musclebind-like 2*) y MBNL3 (*musclebind-like 3*), se localizan en los focos nucleares presentes en las células DM1, uniéndose específicamente a secuencias del tipo YGCY (Y=U,C) en ARN de doble cadena, disminuyendo su disponibilidad en la célula (Fardaei et al., 2002; Goers et al., 2010). Otras proteínas reguladoras del empalme alternativo, como *CUG-BP1* y *ETR3*, pertenecientes a la familia de proteínas CELF han sido involucradas en la patofisiología de la DM1 (Ladd et al., 2001). Timchenko et al (2001) (Timchenko et al., 2001) evidenciaron el incremento de la proteína CUG-BP1 fosforilada en cultivos celulares con la expansión CTG. La repetición CUG en el ARNm de *DMPK* induce a la activación de la proteína quinasa C (*PKC*), la cual hiperfosforila a la proteína CUG-BP, aumentando su nivel de actividad (Kuyumcu-Martinez et al., 2007). En conjunto, la pérdida de función de *MBNL1* y la ganancia de función de CUG-BP1 generan alteraciones en el empalme alternativo de pre-ARN mensajeros de proteínas como el receptor de insulina (*INSR*), asociado al desarrollo de diabetes (Savkur et al., 2001); el canal de cloro (*CLCN1*), asociado al desarrollo de miotonía (Charlet-B et al., 2002); Ca^{2+} -ATPasa sarco/endoplasmática (*SERCA1*), ocasionando debilidad muscular (Kimura et al., 2005); la troponina T cardíaca (*cTNT*), asociada al desarrollo de anomalías en la conducción cardíaca (Philips et al., 1998); y la proteína Tau asociada a microtúbulos (*MAPT*), implicada en la degeneración neuronal (Dhaenens et al., 2011).

2.4.4. *Modelo aditivo de la patogénesis de la DM1*: Este modelo propone que el fenotipo variable y complejo de la DM1 es resultado de la adición de los mecanismos anteriormente descritos. El ARNm mutante de *DMPK* tiene efectos en *cis*, generando la haploinsuficiencia de *DMPK* y de los genes adyacentes *SIX5* y

DMWD; y en *trans* por la acumulación del ARNm mutante en el núcleo y la alteración de los niveles de los factores de transcripción que regulan otros genes (Tapscott, 2000).

2.5. Diagnóstico de la DM1

El diagnóstico definitivo de DM1 se basa en el conteo de los tripletes CTG del gen *DMPK*; sin embargo, existen criterios clínicos y paraclínicos que nos permiten una aproximación diagnóstica razonable.

2.5.1. Diagnóstico clínico de la DM1

La presencia de miotonía, debilidad muscular y de cataratas subcapsulares de inicio temprano (antes de los 50 años) son las principales características y la base de la sospecha clínica de la forma clásica de la DM1 (Hilbert et al., 2013).

2.5.1.1. Electromiografía (EMG). Se presentan ráfagas de unidades motoras a alta frecuencia que van descendiendo en amplitud y frecuencia interna, sonido tipo aceleración o desaceleración de motocicleta o sierra de cadena (Udd & Krahe, 2012).

2.5.1.2. Concentración sérica de creatin fosfoquinasa (CPK). El nivel de CPK puede estar ligeramente elevado aunque no es un marcador específico.

2.5.2. Diagnóstico molecular de la DM1

El diagnóstico molecular de la DM1 se basa en la determinación del número de repeticiones de tripletes CTG en la región 3'-UTR del gen *DMPK*. El uso combinado de la PCR junto con el Southern blot han sido utilizados como técnicas de elección para el diagnóstico de la DM1 (Brook et al., 1992; Fu et al., 1992). A continuación se describen las metodologías utilizadas para el diagnóstico molecular de la DM1:

2.5.2.1. Métodos basados en hibridización molecular

- a. Hibridización por Southern blot.- El método de Southern blot es una herramienta de suma importancia para el diagnóstico de la DM1 (Prior, 2009). Esta es una técnica que permite la detección de una secuencia específica de ADN en un genoma completo (Harvey & Soundy, 2005). Esta metodología se basa en el uso de enzimas de restricción para fraccionar el ADN genómico (Brook et al., 1992; Fu et al., 1992), separar los fragmentos de ADN por electroforesis en agarosa y posteriormente el uso de la transferencia a una membrana de nitrocelulosa en la cual se lleva a cabo la hibridización con un oligonucleótido complementario a la secuencia de ADN de interés, marcado con fluorescencia o radioactividad (Harvey & Soundy, 2005). La metodología de Southern blot permite la detección de secuencias de tamaño de 0.1 a 10 Kb (Strachan & Read, 1999a), permitiendo la detección de alelos patológicos con grandes expansiones (>100 repeticiones CTG hasta 5 kb) (Fu et al., 1992), pero plantea dificultades para la detección de alelos con expansiones pequeñas o no patológicos en DM1. Esta es una metodología muy laboriosa, costosa y que requiere de una alta cantidad de ADN genómico de alto peso molecular (Harvey & Soundy, 2005).
- b. Hibridización *in situ* por fluorescencia (FISH).- En esta técnica de hibridización se utilizan sondas marcadas con el fin de detectar una secuencia diana en particular. La hibridización *in situ* fluorescente de ARN (ARN-FISH) ha sido utilizado para detectar la presencia o ausencia de focos nucleares del ARNm expandido en los núcleos en interfase de las células trofoblásticas en los presuntos fetos DM1 en el diagnóstico prenatal de la DM1 (Bonifazi et al., 2006).

2.5.2.2. Métodos basados en PCR

Se han desarrollado algunas metodologías alternativas para aumentar la eficiencia del diagnóstico molecular de la DM1.

- a. PCR convencional.- La PCR es una técnica de la biología molecular que permite la amplificación selectiva de una secuencia específica de ADN blanco de un conjunto de secuencias de ADN. Esta técnica se basa en la habilidad de la polimerasa de ADN para sintetizar una cadena de ADN complementaria a la secuencia blanco (Strachan & Read, 1999b). Una de las limitaciones de la PCR es el tamaño limitado de los productos obtenidos (hasta 2 Mb), debido a esto, esta técnica es utilizada para la detección de alelos con expansiones pequeñas de hasta 100-125 repeticiones del triplete CTG para alelos no patológicos, siendo considerado como una metodología para la exclusión del rango patológico de la enfermedad (Warner et al., 1996). Esta técnica es menos costosa y más rápida que el Southern blot; sin embargo, para las expansiones mayores a 125 repeticiones la fiabilidad de la detección disminuye (Warner et al., 1996).
- b. Triplet repeat primed – PCR (TP-PCR).- Warner et al (1996) desarrollaron la técnica de TP-PCR como una metodología complementaria a la PCR convencional para el diagnóstico molecular de la DM1. Esta técnica es una variación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que utiliza un juego de tres cebadores: un cebador que flanquea la región repetida (P_1 o P_2), uno que hibridiza a la secuencia repetida CTG (P_{4CTG} o P_{4CAG}) y otro que es complementario a la región 5' del cebador P_{4CTG} o P_{4CAG} (P_{3R}) que se unirá al producto de la amplificación generando una mixtura de fragmentos de diferentes tamaños (Warner et al., 1996). La TP-PCR permite la amplificación del alelo expandido utilizando un cebador específico que hibridiza con la

repetición del triplete CTG, favoreciendo la amplificación de los alelos patológicos de cualquier tamaño (Warner et al., 1996). La fiabilidad, sensibilidad y robustez de la técnica de TP-PCR para el diagnóstico molecular de la DM1 ha sido demostrada por diversos autores (Kumar et al., 2013; Warner et al., 1996). En comparación con la técnica de Southern blot, la TP-PCR es menos costosa, requiere de menor tiempo y no es laboriosa; sin embargo, no es posible conocer el número exacto de las repeticiones CTG, siendo apta solo para la discriminación de la ausencia o presencia de la expansión patológica de la repetición del triplete CTG (Strachan & Read, 1999b; Warner et al., 1996). El uso combinado de la PCR convencional junto con la TP-PCR, constituyen una aproximación eficiente para el diagnóstico de la DM1 con un bajo costo y en un período de tiempo reducido.

- c. Long range – PCR.- El PCR de largo alcance (Long Range-PCR) es una variación de la PCR convencional que permite la amplificación de fragmentos grandes de ADN (>20 Kb) utilizando una mezcla de polimerasas termoestables de ADN: Taq y Pwo (Davies & Gray, 2002). Esta variante de la PCR brinda una mayor resolución en la determinación de repeticiones CTG en comparación con la PCR convencional, detectando hasta 2500 repeticiones CTG (Yum et al., 2013). Este método es más rápido y menos costoso que el análisis de fragmentos por Southern blot y detecta alelos con expansiones superiores que las encontradas por PCR convencional (Yum et al., 2013).
- d. Small-pool PCR (SP-PCR). El small pool – PCR es una variación de la PCR que permite detectar alelos mutantes en moléculas individuales de ADN. Este método requiere de la dilución del ADN genómico de modo que cada reacción contiene unas pocas cadenas de ADN genómico (Gomes-Pereira et al., 2004). La técnica de SP-PCR es una herramienta esencial para analizar la dinámica de las repeticiones de tripletes y comprender los mecanismos moleculares que generan el mosaicismo somático como consecuencia de la inestabilidad de los

tripletes repetidos, mostrando robustez, alta sensibilidad y eficiencia en la evaluación exacta del nivel de variación de longitud de la repetición (Gomes-Pereira et al., 2004).

- e. PCR cuantitativa fluorescente (QF-PCR).- En esta técnica que utiliza sets de cebadores marcados con fluorescencia que flanquean cada lado de la región de interés del gen *DMPK*. Este método se utiliza generalmente en la detección 100 o menos repeticiones CTG y es aplicado en el diagnóstico genético preimplantacional (DGP) (Skrzypczak-Zielinska et al., 2009).

2.5.3. Diagnóstico diferencial de la DM1

La distrofia miotónica tipo 2 (DM2) es una enfermedad de herencia autosómica dominante causada por la presencia de un motivo de repetición CCTG en el gen *ZNF9* en la banda 1 de la región 2 del brazo corto del cromosoma 3 (Bachinski et al., 2003). La DM2 es clínicamente similar a la DM1, se caracteriza por miotonía, debilidad y dolor muscular, defectos en la conducción cardíaca, cataratas subcapsulares, diabetes y atrofia testicular (Turner & Hilton-Jones, 2010). Un signo diferencial entre la DM2 y la DM1 es que la DM2 no presenta una forma congénita de la enfermedad como si ocurre con la DM1. Además, la edad promedio de inicio en la DM2 es mayor que en la DM1 (Hilbert et al., 2013). Otras enfermedades que presentan superposición de algunos signos clínicos con la DM1 son: La paramiotonía congénita y parálisis periódica. La miopatía de cuerpo de inclusión (IBM) y la miopatía miofibrilar hereditaria (MFM) son miopatías distales hereditarias que presentan debilidad muscular progresiva como en la DM1 (Mastaglia & Laing, 1999). Las formas dominantes de miotonía congénita que presentan contracciones musculares prolongadas en las manos, la cara y los párpados como la enfermedad de Becker y Thomsen (Zellweger & Ionasescu, 1973).

2.6. Importancia de la DM1 en el Perú

Se considera una enfermedad rara aquella que afecta a no más de 5 personas por cada 10 000. Según el XI Censo Nacional de Población realizado en el 2007 somos alrededor de 27 millones de peruanos, ello implicaría tener alrededor de 14 000 personas afectadas. Las personas con enfermedades raras o huérfanas constituyen un grupo de población que requiere de atención especializada en la prestación de servicios de salud. Se estima que alrededor del 7% de la población mundial está afectado por alguna de las 7 mil enfermedades raras identificadas (<http://www.who.int/en/>).

En el Perú, desde el 04 de junio del año 2011 rige la Ley N° 29698, ley que declara de interés nacional y preferente el tratamiento 399 enfermedades raras o huérfanas. Aunque la DM1, una enfermedad huérfana, es la distrofia más frecuente en adultos (Romeo, 2012), esta se encuentra en el grupo de muy baja prioridad de las enfermedades raras consideradas por la ley antes mencionada. Esta enfermedad recibe poca atención por parte de fondos privados, por lo que la atención de estos pacientes es completamente dependiente de los servicios de salud públicos. En este contexto, el CIBN es el único centro de referencia en el Perú dedicado a la atención de pacientes con DM1 (<http://incngen.org.pe/>), recibiendo casos provenientes de entidades públicas y privadas. Hasta el momento, 243 individuos con sospecha clínica de DM1 han sido registrados en el CIBN y sólo en el año 2014, se han registrado 40 atenciones a pacientes diagnosticados clínicamente con DM1 (CIBN, 2014). Desde el 2010, mediante una alianza internacional con la Rede Neurogenética de Brasil, logramos confirmar el diagnóstico de 24 pacientes con DM1; sin embargo, el tiempo requerido para obtener el diagnóstico molecular de esta enfermedad es muy prolongado, en ocasiones de hasta un año, retardando el pronóstico correcto en los pacientes. La creciente demanda de atenciones de DM1 ha generado la necesidad de confirmar el diagnóstico rápidamente, por lo que es fundamental desarrollar una metodología para el diagnóstico molecular de esta enfermedad que permita confirmar rápidamente el diagnóstico en laboratorios que

cuentan con técnicas básicas de biología molecular. El uso de una metodología basada en la combinación de las técnicas de PCR y TP-PCR para el diagnóstico molecular de la DM1 es una estrategia atractiva para el diagnóstico molecular de DM1 por lo que ha sido escogido por varios laboratorios alrededor del mundo, ya que es una metodología más rápida que la técnica estándar y no requiere equipamiento sofisticado para desarrollarla (Singh et al., 2014). La implementación del diagnóstico genético-molecular de la DM1 basado en TP-PCR en el Laboratorio de Neurogenética del CIBN beneficiará directamente a las personas diagnosticadas clínicamente con DM1 reduciendo el tiempo de la confirmación molecular con una robustez similar a la técnica estándar, mejorando así el seguimiento clínico para el tratamiento de esta patología, y previniendo potenciales complicaciones relacionadas al desarrollo de la enfermedad, algunas de las cuales son potencialmente mortales (Pelargonio et al., 2002). Además, permitirá ofrecer un mejor asesoramiento genético, informando y orientando al paciente, y al resto de la familia sobre la enfermedad para la toma de futuras decisiones.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Implementar una metodología basada en la combinación de las técnicas de PCR y TP-PCR para el diagnóstico molecular de la distrofia miotónica tipo 1 en el Centro de Investigación Básica en Neurogenética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas.

3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1. Determinar las mejores condiciones para la amplificación del alelo normal del microsatélite CTG del gen *DMPK* a través de la técnica de PCR.
- 3.2.2. Determinar las mejores condiciones para la amplificación del alelo mutante del microsatélite CTG del gen *DMPK* a través de la técnica de TP-PCR.
- 3.2.3. Estimar la frecuencia de alelo patológico del gen *DMPK* aplicando la metodología basada en las técnicas combinadas de PCR y TP-PCR en los pacientes diagnosticados clínicamente con DM1 en el CIBN del INCN en el periodo 2009-2014.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Tipo y diseño de estudio

Estudio de sistematización. Diseño experimental de intervención sin aleatorización.

4.2. Población

- 24 muestras de ADN con genotipo conocido (20 muestras DM1 positivo, 1 muestra en rango de premutación y 3 muestras DM1 negativo), realizado por la *Rede Neurogenetica* de Brasil.
- 72 muestras de ADN de pacientes con diagnóstico clínico de DM1 obtenidas de la ADNteca del CIBN-INCN.

4.3. Materiales

4.3.1. Implementos moleculares

- Cebador P₁: 5'- AGAAAGAAATGGTTCTGTGATCCC-3'
- Cebador P₂: 5'-GAACGGGGCTCGAAGGGTCCTTGTAGCCG-3'
- Cebador P_{3R}: 5'-TACGCATCCCAGTTTGAGACG-3'
- Cebador P_{4CAG}:
5'-TACGCATCCCAGTTTGAGACGCAGCAGCAGCAGCAGCA-3'
- GeneAmp® dNTPs mix: A, T, G y C (2.5 mM c/u)
- DMSO 100% (Sigma-Aldrich)
- 360 CG Enhancer 100% (Applied Biosystems™).
- Platinum® Taq DNA polymerase 5 U/μL (Invitrogen). Incluye: Buffer PCR 10x y MgCl₂ 50 mM.
- Amplitaq Gold 360 ® DNA polymerase 5 U/μL (Applied Biosystems™). Incluye: Buffer PCR 10x y MgCl₂ 25 mM.
- Long PCR Enzyme mix 5 U/μL (Thermo Scientific). Incluye: Buffer PCR 10x y MgCl₂ 25 mM.
- Marcador de peso molecular de 20 pb (Invitrogen).

- Marcador de peso molecular de 10 pb (Invitrogen).

4.3.2. Reactivos

- Acrilamida
- Bisacrilamida
- TEMED
- APS
- Tris
- Ácido bórico
- EDTA
- Xilencianol
- Azul de Bromofenol
- Glicerol
- Etanol absoluto
- Ácido acético
- Nitrato de Plata (AgNO_3)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Formaldehído 37%

4.3.3. Material de plástico

- Tips 10 μL , 20 μL , 100 μL , 200 μL , 1000 μL
- Tubos de PCR 0.2 mL
- Tubos de centrifuga 1.5 mL
- Gradillas para tubos de 0.2 mL y 1.5 mL
- Pissetas

4.3.4. Material de vidrio

- Matraz aforado
- Probetas
- Vasos de precipitados
- Pipetas 1 mL, 5 mL, 10 mL y 25 mL.

- Propipetas
- Frascos
- Baguetas

4.3.5. Equipos

- Micropipetas 10 µL, 20 µL, 50 µL, 100 µL, 200 µL y 1000 µL.
- Termociclador Veriti® (Applied Biosystems®)
- Termociclador GeneAmp® 9700 (Applied Biosystems®)
- Espectrofotómetro Epoch (Biotek)
- Cabina de PCR (ESCO®)
- Cámaras de electroforesis vertical (CIBN-INCN)
- Fuente poder (MRC)
- Balanza analítica (Shimadzu)
- Centrífuga (Eppendorf)
- Agitador magnético (Velp)
- Escáner (HP)
- Refrigeradores a 4 °C (Bosch y Coldex)
- Congeladora a -8 °C/-20 °C (Frigidaire)

4.4. Metodología

4.4.1. Optimización de la técnica de genotipificación del gen *DMPK*.

4.4.1.1. Obtención de las muestras de ADN

Las 96 muestras de ADN (24 genotipificadas por la Rede Neurogenética y 72 por genotipificar mediante este estudio) fueron extraídas a partir de sangre periférica de individuos con sospecha clínica de DM1, durante el periodo 2009-2014, empleando el método convencional de salting-out implementado en el CIBN (**Anexo 1**). Posteriormente, fueron almacenadas en la ADNteca del CIBN.

4.4.1.2. Selección de las muestras

Se seleccionaron 24 muestras de ADN con genotipo conocido, obtenido a través de la Rede Neurogenética de Brasil (<http://www.ufrgs.br/redeneurogenetica/>), la información se resume en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Genotipos de las muestras de ADN seleccionadas para la optimización de la genotipificación del gen *DMPK*.

Código	Genotipo	Tipo de muestra
M1	13/10	DM1 negativo
M2	11/11	DM1 negativo
M3	11/11	DM1 negativo
M4	5/>50	DM1 positivo
M5	5/>50	DM1 positivo
M6	10/>50	DM1 positivo
M7	10/>50	DM1 positivo
M8	11/>50	DM1 positivo
M9	11/>50	DM1 positivo
M10	12/>50	DM1 positivo
M11	12/>50	DM1 positivo
M12	12/>50	DM1 positivo
M13	12/>50	DM1 positivo
M14	13/>50	DM1 positivo
M15	13/>50	DM1 positivo
M16	13/>50	DM1 positivo
M17	13>50	DM1 positivo
M18	13/>50	DM1 positivo
M19	13/>50	DM1 positivo
M20	13/>50	DM1 positivo
M21	14/>50	DM1 positivo
M22	21/>50	DM1 positivo
M23	10/>50	DM1 positivo
M24	13/45	Premutación

Las muestras M1 a M24 corresponden a individuos con sospecha clínica de DM1 atendidos en CIBN. La genotipificación de estas muestras fue realizada por la Rede Neurogenética de Brasil.

Se distribuyeron alícuotas de 20 µL de cada muestra de ADN en tubos estériles de 0.2 mL y fueron almacenados a -8 °C. La medición de la concentración y la pureza del ADN de cada muestra se realizó por espectrofotometría Ultravioleta-Visible a longitudes de ondas de 230, 260 y 280 nm.

Para estandarizar la técnica de PCR para la genotipificación del alelo normal del gen *DMPK*, se seleccionaron algunas muestras de ADN con genotipos representativos tanto de alelos normales, premutación y patológicos.

4.4.1.3. Estandarización de la técnica de PCR para genotipificar el alelo normal del gen *DMPK*

a. Protocolo de amplificación por PCR convencional inicial

Se realizó una amplificación inicial por PCR convencional basado en el protocolo para la genotipificación del alelo normal del gen *DMPK* (Warner et al., 1996) utilizando la enzima Platinum® Taq DNA polimerasa y los cebadores:

- P₁: 5'- AGAAAGAAATGGTTCTGTGATCCC-3'
- P₂: 5'-GAACGGGGCTCGAAGGGTCCTTGTAGCCG-3'

Bajo las siguientes condiciones: DMSO 10%, Buffer PCR 1X, 1.5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 1 µM de cada cebador (P₁ y P₂), 0.05 U/µL de la enzima polimerasa Platinum (Invitrogen) y 40 ng de ADN en un volumen de reacción final de 10 µL. El programa de amplificación fue: un ciclo de denaturación inicial de 94 °C por dos minutos; seguido de 30 ciclos de, denaturación a 94 °C por 1 minuto, una temperatura de hibridización de 60 °C por 1 minuto y una temperatura de extensión de 72 °C por dos minutos; finalmente, una extensión de 72 °C por diez minutos en un termociclador.

Los productos de amplificación fueron fraccionados por electroforesis vertical en gel de poliacrilamida no denaturante al 8% empleando 1 µL de buffer de siembra 4x, 1 µL del producto de amplificación y 2 µL de agua tridestilada. La

corrida electroforética se realizó con un potencial eléctrico de 150V por 3 horas en solución tampón TBE 1X. Los productos de amplificación fueron visualizados mediante tinción argéntica: Solución A por 5 minutos, solución B por 2 minutos y solución C por 10 minutos. El gel fue digitalizado empleando un escáner (**Anexo 2**).

b. Variación del protocolo de amplificación por PCR convencional inicial.

Basado en los parámetros, previamente reportados por Warner et al. (1996), se realizaron variaciones en el programa de amplificación, el tipo de enzima polimerasa y coadyuvante, la concentración de cloruro de magnesio, la concentración de ADN, la concentración de cebadores y la concentración de la enzima polimerasa que mostró mejor desempeño. Se escogieron los mejores parámetros de amplificación para obtener el protocolo optimizado para la genotipificación del alelo normal del gen *DMPK*.

Los productos de amplificación fueron fraccionados por electroforesis vertical en gel de poliacrilamida no denaturante al 8% en las mismas condiciones que se realizó para el protocolo de amplificación inicial por PCR convencional (**ver 4.4.1.3.a y Anexo 2**).

c. Selección de marcadores

Se amplificaron las 24 muestras de ADN con genotipo conocido (**Tabla 2**) empleando el protocolo de PCR convencional previamente optimizado. Se seleccionaron alelos de tamaño distinto para generar los marcadores de inferencia para genotipificar el alelo normal del gen *DMPK*. Estos alelos fueron combinados para generar dos diferentes sets de marcadores.

4.4.1.4. Estandarización de la técnica de TP-PCR para genotipificar el alelo expandido del gen *DMPK*

a. Protocolo inicial de amplificación por TP-PCR.

Se realizó la amplificación por TP-PCR inicial en base al protocolo propuesto por Warner et al. (1996), empleando las seis muestras de ADN seleccionadas para la optimización de la técnica de PCR convencional; utilizando la enzima Long PCR DNA polimerasa y los siguientes cebadores:

- P₂: 5'-GAA CGGGGCTCGAAGGGTCCTTGTAGCCG-3'

- P_{3R}: 5'-TACGCATCCCAGTTTGAGACG-3'

- P_{4CAG}:

5'-TACGCATCCCAGTTTGAGACGCGCAGCAGCAGCAGCA-3'.

Los productos de amplificación fueron fraccionados por electroforesis vertical en gel de poliacrilamida no denaturante al 8% empleando 1 µL de buffer de siembra 4x, 3 µL del producto de amplificación y 2 µL de agua tridestilada. La corrida electroforética se realizó con un potencial eléctrico de 150V por 5 horas en solución tampón TBE 1X. Los productos de amplificación fueron visualizados mediante tinción argéntica: Solución A por 5 minutos, solución B por 2 minutos y solución C por 10 minutos. El gel fue digitalizado empleando un escáner (**Anexo 2**).

b. Variación del protocolo de amplificación por TP-PCR inicial.

Se realizaron variaciones en la concentración de los cebadores, proporción de los cebadores, concentración de cloruro de magnesio y concentración de enzima polimerasa. Se escogieron los mejores parámetros de amplificación para obtener el protocolo optimizado para genotipificar el alelo expandido del gen *DMPK*. Se escogió un control negativo (11/11) y un control positivo (11/>50) de las 6 muestras evaluadas.

Los productos de amplificación fueron fraccionados por electroforesis vertical en gel de poliacrilamida no denaturante al 8% en las mismas condiciones que se

realizó para el protocolo inicial de amplificación para TP-PCR (**ver 4.4.1.4.a y Anexo 2**).

4.4.2. Genotipificación del gen *DMPK* en pacientes con diagnóstico clínico de DM1 en el CIBN del INCN.

Se genotipificaron 72 muestras de ADN de individuos con diagnóstico clínico de DM1 en el CIBN utilizando los protocolos previamente optimizados para la genotipificación del alelo normal por PCR y para la detección del alelo expandido por TP-PCR.

4.5. Aspectos éticos

- Este trabajo de investigación fue aprobado por el Comité de ética en investigación del INCN (**Anexo 3**).
- Las muestras de ADN utilizadas fueron obtenidas previo proceso de consentimiento informado, y firma del formato de consentimiento de investigación del CIBN-INCN (**Anexo 4**).
- Todos los investigadores que participaron de este estudio firmaron un compromiso de confidencialidad de los datos y procesos (**Anexo 5**).

5. RESULTADOS

5.1. Optimización de la técnica de genotipificación del microsatélite CTG del gen *DMPK*.

5.1.1. Selección de muestras

Se seleccionaron, a conveniencia, 6 muestras de ADN (7 alelos diferentes) con genotipo conocido y que cumplieran con los criterios de inclusión referentes a calidad, concentración e índice de pureza (**Tabla 3**).

Tabla 3. Muestras de ADN con genotipo conocido seleccionadas para la optimización de la técnica de genotipificación del microsatélite CTG del gen *DMPK*.

Tipo de muestra	Código	Genotipo (repeticiones CTG)
Positivo para DM1	M5	5 />50
	M20	13 />50
	M22	21 />50
Premutación	M25	13 /~45
Negativo para DM1	M1	13 /10
	M2	11 /11

Estas muestras fueron seleccionadas a partir de las 24 muestras de ADN cuya genotipificación fue realizada por la *Rede Neurogenetica* de Brasil.

5.1.2. Estandarización de la técnica de PCR convencional para genotipificar el alelo normal del gen *DMPK*

5.1.2.1. Protocolo de amplificación por PCR convencional para genotipificar el alelo normal del gen *DMPK*.

Los productos de amplificación obtenidos (**Figura 1**) presentaron múltiples fragmentos inespecíficos que no permitían identificar correctamente las bandas correspondientes a los alelos del gen *DMPK*. Así también, se evidenciaron bandas muy tenues en fragmentos de longitud mayor a 196 pb (~45 CTG).

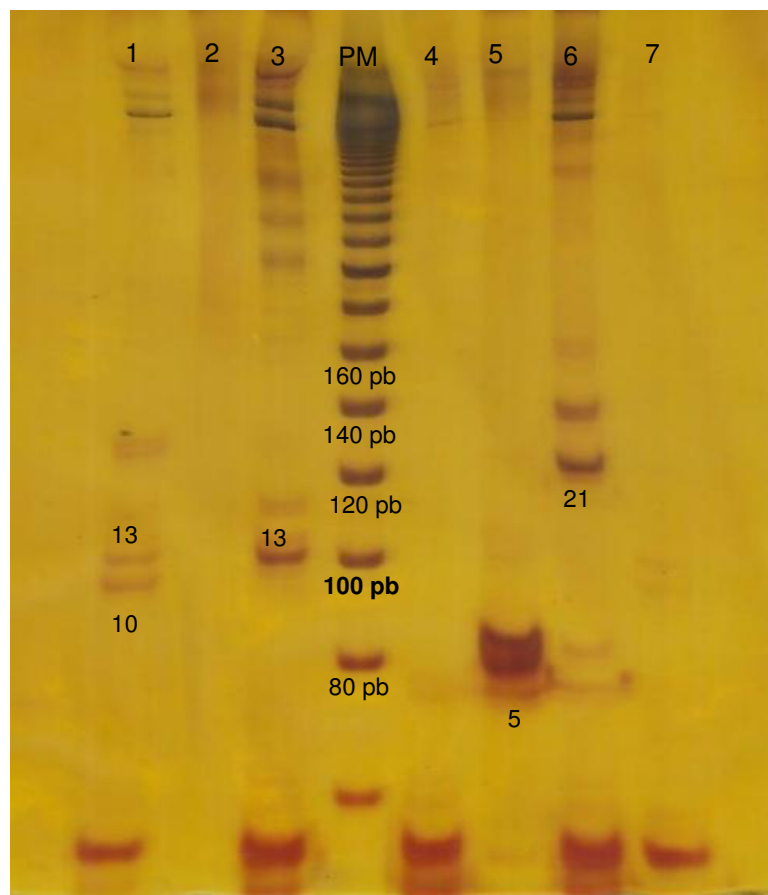


Figura 1: Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos con el protocolo inicial de PCR convencional para genotipificar el alelo normal del gen *DMPK*. Fraccionamiento electroforético en gel de poliacrilamida no denaturante al 8%. Carril 1 y 2: muestras negativas para DM1. Carril 3: muestra de premutación. Carril PM: marcador de peso molecular de 20 pb. Carril 4, 5 y 6: muestras positivas para DM1. Carril 7: blanco de amplificación (sin ADN). La flecha indica el patrón de bandas mayor a 196 pb, entre las cuales no se puede determinar el alelo en premutación.

5.1.2.2. Variación del protocolo de amplificación por PCR convencional para genotipificar el alelo normal del gen *DMPK*

Las modificaciones realizadas al protocolo original de Warner et al (1996), se resumen en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Variaciones al protocolo de amplificación por PCR convencional para la genotipificar el alelo normal del gen *DMPK*.

Programa de amplificación (Ensayo A)	A1	Denaturación inicial		94 °C	2'
		30	Denaturación	94 °C	1'
			Hibridización	60 °C	1'
			Extensión	72° C	2'
		Extensión final		72 °C	10'
		Temperatura de conservación		4 °C	∞
	A2	Denaturación inicial		94 °C	2'
		30	Denaturación	94 °C	30''
			Hibridización	60 °C	30''
			Extensión	72° C	1'
		Extensión final		72 °C	10'
		Temperatura de conservación		4 °C	∞

Tipo de enzima y coadyuvante (Ensayo B)	B1	Platinum® Taq DNA polimerasa + DMSO 10%
	B2	Amplitaq Gold® 360 DNA polimerasa + DMSO 10%
	B3	Amplitaq Gold® 360 DNA polimerasa + 360 GC Enhancer 10%

[MgCl ₂] (mM) (Ensayo C)	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
	0.5	0.75	1	1.25	1.5	1.75	2

[ADN] (ng/μL) (Ensayo D)	D1	D2	D3
	1	2	4

[Cebadores] (μM) (Ensayo E)	E1	E2	E3
	0.5	0.75	1

[Enzima polimerasa] (U/μL) (Ensayo F)	F1	F2
	0.5	0.75

Los recuadros sombreados en celeste indican las mejores condiciones halladas para la amplificación. Ver **anexo 6**.

La intensidad de los fragmentos obtenidos y la presencia de productos inespecíficos empleando el programa de amplificación A2, de menor duración, fueron muy similares a los obtenidos utilizando el programa de amplificación A1. Por esta razón, se seleccionó el programa de amplificación A2, ya que nos permitió reducir el tiempo de amplificación (**Tabla 4**).

En el ensayo B, referente al tipo de enzima y coadyuvante, los mejores resultados se evidenciaron empleando la enzima *Amplitaq Gold® 360 DNA polimerasa* y 360 GC *Enhancer* al 10% (Ensayo B3) (**Tabla 4**). Se evidenció una mayor intensidad en la banda que corresponde al rango de premutación en comparación con los ensayos B1 y B2, así como la ausencia de bandas inespecíficas.

Los ensayos C4, D3, E2 y F2 (**Tabla 4**) permitieron optimizar las condiciones finales de amplificación.

5.1.2.3. Condiciones finales de estandarización de PCR convencional

El protocolo optimizado para genotipificar el microsatélite CTG normal en el gen *DMPK*, es el siguiente:

- 360 GC Enhacer al 10%, Buffer de PCR Amplitaq Gold® 360 1X, 1.25 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0.75 µM de cada cebador (P₁ y P₂), 0.08 U/µL de la enzima AmpliTaq Gold® 360 DNA polimerasa y 40 ng de ADN en un volumen de reacción final de 10µL (**Anexo 7**).
- El programa de amplificación fue: un ciclo de denaturación inicial de 94 °C por dos minutos; seguido de 30 ciclos de, denaturación a 94 °C por 30 segundos, una temperatura de hibridización de 60 °C por 30 segundos y una temperatura de extensión de 72 °C por un minuto; finalmente, una extensión de 72 °C por diez minutos en un Termociclador Veriti®. Los productos de amplificación obtenidos se muestran en la **Figura 2**.

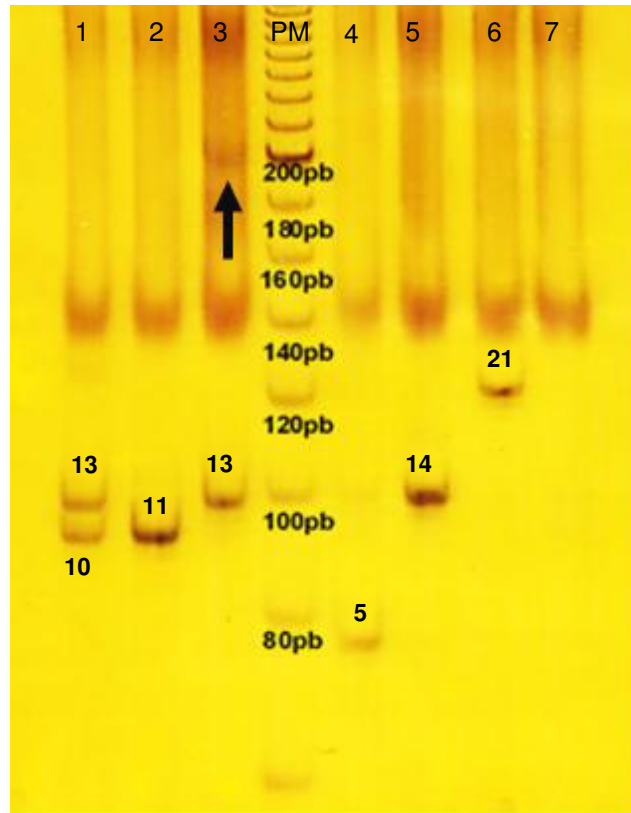


Figura 2: Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos con el protocolo optimizado de PCR convencional para genotipificar el alelo normal del gen *DMPK* Fraccionamiento electroforético en gel de poliacrilamida no denaturante al 8%. Carril 1 y 2: muestras negativas para DM1. Carril 3: muestra de premutación. Carril PM: marcador de peso molecular de 20 pb. Carril 4, 5 y 6: muestras positivas para DM1. Carril 7: blanco de amplificación (sin ADN). La flecha indica el patrón de bandas mayor a 200 pb correspondiente al alelo premutado.

5.1.2.4. Selección de marcadores

Los marcadores generados se encuentran en el rango de 5 a 21 repeticiones CTG. El marcador L1 contiene los alelos 5CTG, 11 CTG y 13 CTG y el marcador L2 contiene los alelos 11 CTG, 14 CTG y 21 CTG (**Figura 3**).

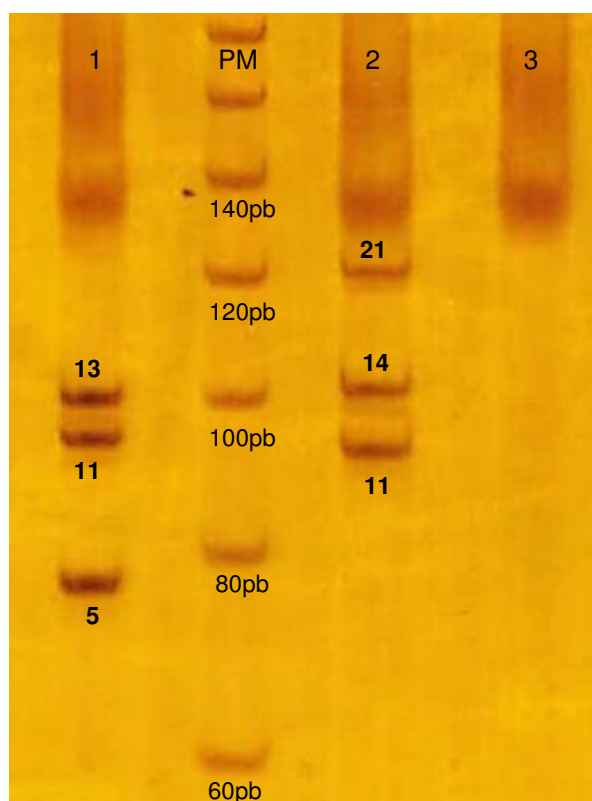


Figura 3. Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos con el protocolo optimizado de PCR convencional usando los marcadores seleccionados para genotipificar los alelos normales del gen *DMPK*. Fraccionamiento electroforético en gel de poliacrilamida no denaturante al 8%. Carril 1: Marcador L1 (5/11/13 CTG). Carril PM: marcador de peso molecular de 20 pb. Carril 2: Marcador L2 (11/14/21 CTG). Carril 3: blanco de amplificación (sin ADN).

5.1.3. Estandarización de la técnica de TP-PCR para genotipificar el alelo expandido del gen *DMPK*.

5.1.3.1. Protocolo inicial de amplificación por TP-PCR para discriminar el alelo expandido del gen *DMPK*.

La migración de los productos del protocolo TP-PCR mostró un patrón de migración en escalera o de aspecto de mancha alargada (*smear*) que permitía discriminar entre muestras positivas y negativas para DM1; sin embargo la intensidad de las bandas por debajo de 200 pb fue baja (**Figura 4**).

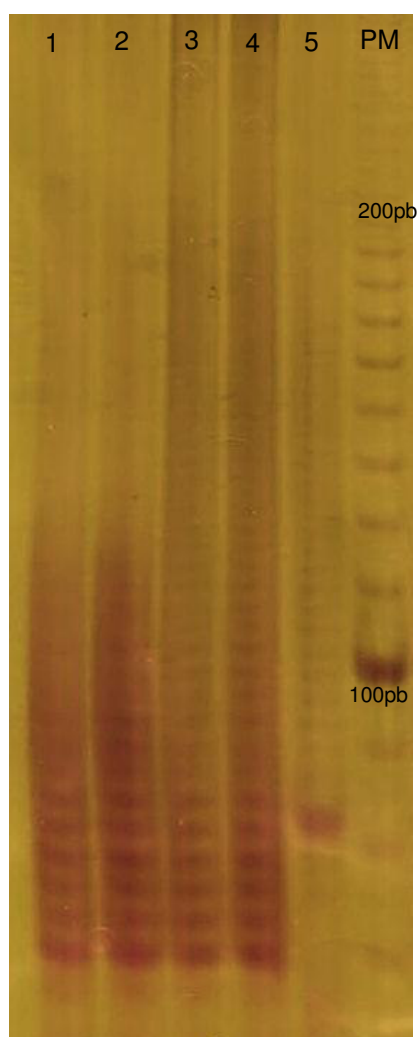


Figura 4: Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos con el protocolo inicial de TP-PCR para discriminar el microsatélite CTG expandido en el gen *DMPK*. Fraccionamiento electroforético en gel de poliacrilamida no denaturante al 8%. En cada pocillo se cargó 3 μ L del volumen de reacción. Carril 1, 3 y 4: muestras positivas para DM1 (heterocigoto afectado). Carril 2: muestra negativa para DM1 (homocigoto no afectado). Carril 5: blanco de amplificación (sin ADN). Carril PM: marcador de peso molecular de 10 pb.

5.1.3.2. Variación del protocolo de amplificación por TP-PCR para genotipificar el alelo expandido del gen *DMPK*.

Las modificaciones realizadas al protocolo de amplificación inicial por TP-PCR se resumen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Variaciones al protocolo de amplificación por TP-PCR para la detección del alelo en rango patológico del gen *DMPK*.

Proporción de cebadores: P ₂ /P ₄ CAG/P _{3R} (μM) (Ensayo G)	G1	1:0.1:1	G4	2:0.2:2	G7	3:0.3:3
	G2	1:0.2:1	G5	2:0.4:2	G8	3:0.6:3
	G3	1:0.3:1	G6	2:0.6:2	G9	3:0.9:3

[MgCl ₂] (mM) (Ensayo H)	H1	H2	H3	H4	H5	H6
	0.5	0.75	1	1.25	1.5	1.75

[Enzima polimerasa] (U/μL) (Ensayo I)	I1	I2	I3
	0.05	0.075	0.1

Los recuadros sombreados en celeste indican las mejores condiciones halladas para la amplificación. **Ver anexo 8.**

5.1.3.3. Condiciones finales de estandarización de TP-PCR

El protocolo optimizado para la discriminación del microsatélite CTG expandido en el gen *DMPK* por TP-PCR es como sigue: DMSO al 4%, Buffer de PCR 1x, 1.25 mM de MgCl₂, 250 μM de cada dNTP, 2 μM, 0.4 μM y 2 μM de cebadores P₂, P₄CAG y P_{3R} respectivamente, 0.1 U/μL de la enzima Long polimerasa (Invitrogen) y 40 ng de ADN en un volumen de reacción final de 10 μL (**Anexo 9**). El programa de amplificación fue: un ciclo de denaturación inicial de 94 °C por cinco minutos; seguido de 10 ciclos de, denaturación a 96 °C por 10 segundos, una temperatura de alineamiento/extensión de 68 °C por 4 minutos; seguido de 20 ciclos de, denaturación a 94 °C por 20 segundos, una temperatura de alineamiento/extensión de 68 °C por 4 minutos agregando dos segundos por cada ciclo de amplificación; finalmente, una extensión de 68 °C por diez minutos en un termociclador GeneAmp® 9700. Los productos de amplificación obtenidos se muestran en la **Figura 5**.

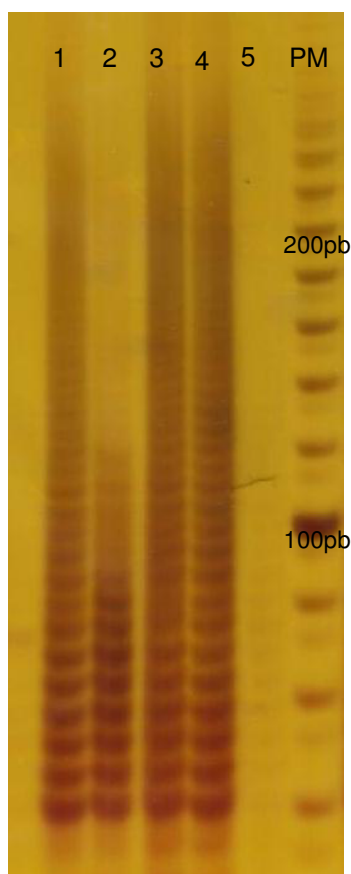


Figura 5. Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos con el protocolo optimizado de TP-PCR para discriminar el microsatélite CTG expandido en el gen *DMPK*. Fraccionamiento electroforético en gel de poliacrilamida no denaturante al 8%. En cada pocillo se cargó 3 μ L del volumen de reacción. Carril 1, 3 y 4: muestras positivas para DM1 (heterocigoto afectado). Carril 2: muestra negativa para DM1 (homocigoto no afectado). Carril 5: blanco de amplificación (sin ADN). Carril PM: marcador de peso molecular de 20 pb. Nótese el patrón de migración en escalera o de aspecto de mancha alargada (smear) característico de los productos de amplificación en la TP-PCR.

5.2. Genotipificación del gen *DMPK* en pacientes con diagnóstico clínico de DM1 en el CIBN-INCN.

Se genotipificaron 72 muestras de ADN de individuos con sospecha clínica de DM1 empleando la técnica combinada de PCR y TP-PCR previamente estandarizada. En las **Figura 6 y 7** se muestran los productos de amplificación obtenidos con las técnicas de PCR y TP-PCR, respectivamente.

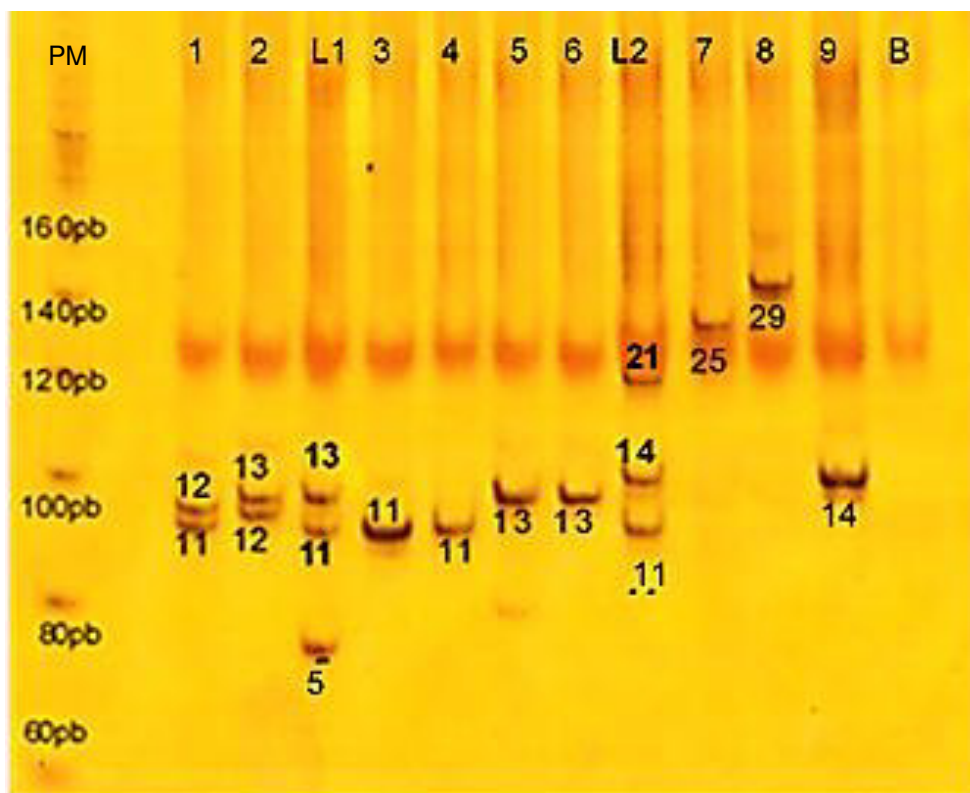


Figura 6: Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos por PCR convencional para genotipificar el alelo normal del microsatélite CTG en el gen *DMPK*. Fraccionamiento electroforético en gel de poliacrilamida no denaturante al 8%. Carril PM: marcador de peso molecular de 20 pb; Carriles 1-9: muestras de 9 individuos con diagnóstico clínico de DM1 del CIBN; Carril L1: marcador de los alelos 5 CTG, 11 CTG y 13CTG; Carril L2: marcador de los alelos 11 CTG, 14 CTG y 21 CTG; Carril B: blanco de amplificación (sin ADN). El patrón de bandas de los individuos 3 y 5 son similares al patrón de bandas de los individuos 4 y 6.

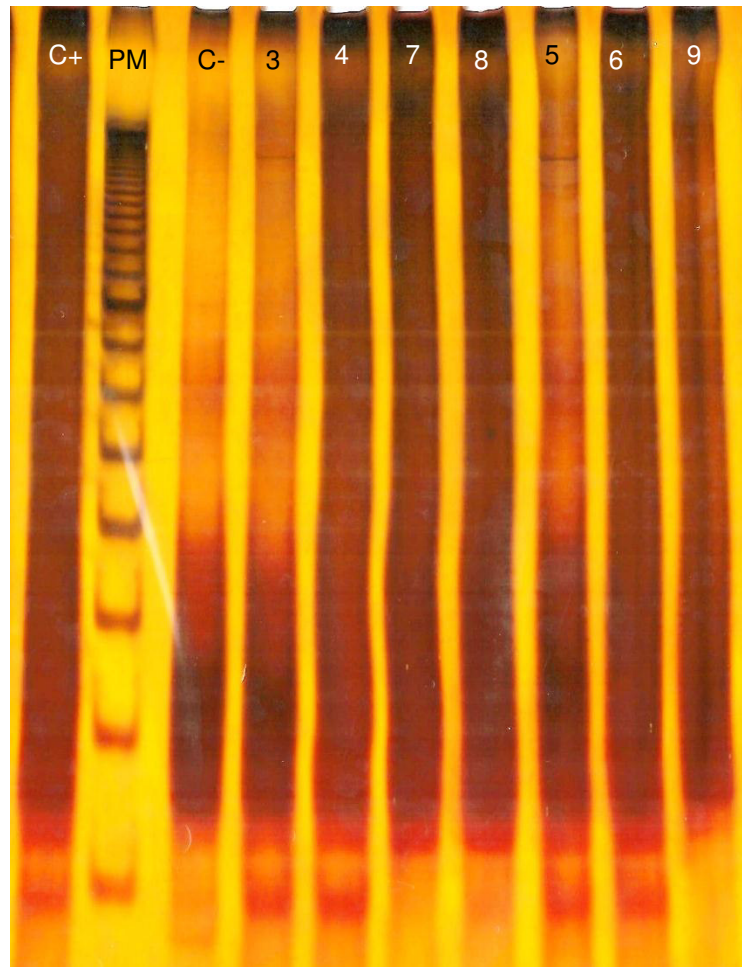


Figura 7: Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos por TP-PCR para detectar el rango patológico del gen *DMPK* utilizando los controles seleccionados. Fraccionamiento electroforético en gel de poliacrilamida no denaturante al 8%. Carril C+: muestra positiva para DM1; Carril PM: marcador de peso molecular de 20 pb; Carril C-: muestra negativa para DM1. Carriles 3-9: muestras con resultado no conclusivo por PCR convencional (presencia de una banda) de 7 individuos con diagnóstico clínico de DM1 del CIBN. Se observan diferencias en el patrón de bandas de los pares de muestras 3 y 5 comparadas con las muestras 4 y 6. Las muestras 3 y 5 no presentan un alelo en rango expandido por ser homocigotos (patrón de bandas debajo de 201 pb), mientras que las muestras 4 y 6 son heterocigotos afectados (patrón de bandas superior a 201pb).

5.2.1. Distribución del alelo normal en las muestras estudiadas.

La distribución de alelos normales del microsatélite del gen *DMPK* en las muestras estudiadas tiene una distribución modal. Se encontró un total de 9 alelos diferentes, entre 5 y 29 repeticiones CTG, siendo el alelo de 13 CTG el más frecuente (45%). El 97.5% de los alelos eran menores a 15 repeticiones CTG (**Ver Figura 8**).

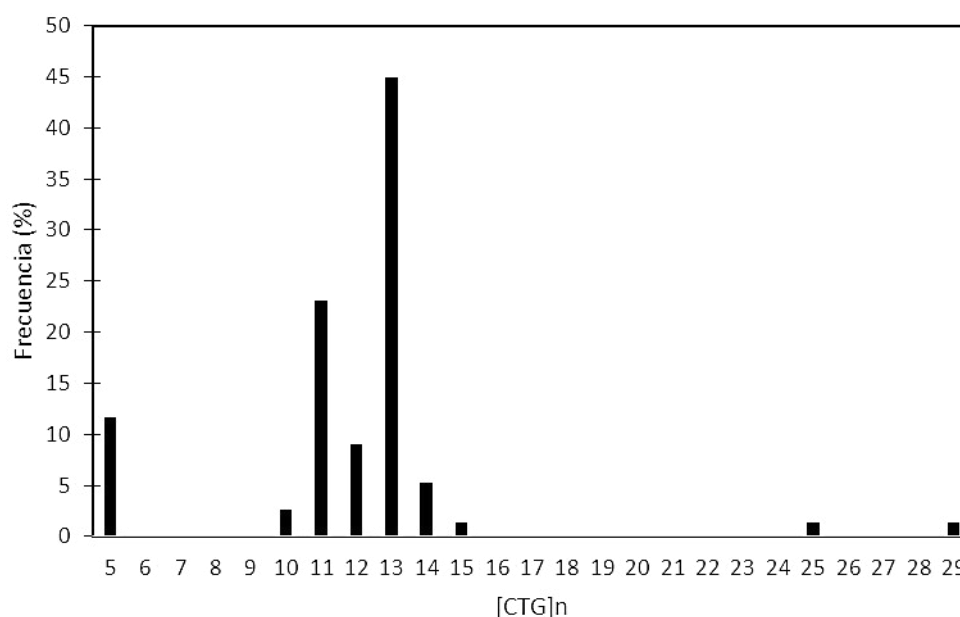


Figura 8. Distribución alélica del microsatélite CTG del gen *DMPK* no afectado de 72 casos analizados.

5.2.2. Frecuencia de DM1 con confirmación molecular en la muestra estudiada

Se confirmó la presencia del alelo expandido en el 91.7% (66/72) de las muestras de individuos analizadas, incluyendo 47 varones y 25 mujeres. Las características de los casos DM1 positivos y DM1 negativos se presentan en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Características de los casos DM1 positivos y DM1 negativos.

Características	Casos DM1 positivos (n=66)	Casos DM1 negativos (n=6)
Distribución sexual:		
Masculino	68,20% (45/66)	33,30% (2/6)
Femenino	31,80% (21/66)	66,70% (4/6)
Lugar de Origen	Lima 66,7%	Lima 50%
	Cuzco 10,6%	Ica 16,7%
	Puno 9,1%	Apurímac 16,7%
	Otros 13,6%	Huancavelica 16,6%
Edad de inicio	25,8 ±13,4 [3-59]	20,8 ± 19,8 [0-58]
Debilidad muscular	96,90%	100%
Miotonía	96,90%	66,70%
Cataratas	31%	0%
Cardiopatías	90,70%	25%
Trastornos del sueño	80,30%	80%
Diabetes mellitus	6,80%	20%

En esta tabla se detalla la distribución sexual, el lugar de origen y el porcentaje de presencia de las características clínicas representativas de DM1 (edad de inicio, debilidad muscular, miotonía, cataratas, trastornos del sueño y diabetes mellitus) en los casos DM1 positivos (columna 2) y negativos (columna 3). Es resaltante la alta proporción de individuos DM1 positivos provenientes de la región central del país.

Seis de 72 (8.3%) muestras analizadas fueron negativas para DM1. Las características clínicas de estos individuos se resumen en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Características clínicas de los seis individuos con resultado negativo para DM1.

Individuo		I1	I2	I3	I4	I5	I6
Sexo		Femenino	Femenino	Masculino	Masculino	Femenino	Femenino
Edad de inicio		58	33	9	20	5	0
Antecedente Familiar		NR	NR	No	No	Si	Si
Transmisión		Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Ninguna	Materna
Tipo de herencia		Aparentemente de novo	Aparentemente de novo	Aparentemente recesivo	Aparentemente recesivo	Aparentemente recesivo	Dominante
Características clínicas	Miotonía	Si	Si	Si	Si	No	No
	Cataratas	No	No	No	No	No	No
	Debilidad muscular	Si	Si	Si	Si	Si	Si
	Endocrinopatías	Si	No	No	No	No	Si
	Anomalías cardíacas	NR	NR	Si	Si	Si	No
	Calvicie	Si	Si	No	No	No	No

NR: No registrado. En esta tabla se pueden observar el detalle de algunas características clínicas de los individuos DM1 negativos. Es notable la ausencia de transmisión de la enfermedad y el aparente herencia recesiva y de novo presente en estos individuos. Una de las características clínicas más representativas en la DM1 es la presencia de cataratas; sin embargo, ningún individuo presento esta característica.

6. DISCUSIÓN

En este estudio, se implementó una metodología basada en PCR y TP-PCR para la genotipificación del microsatélite CTG del gen *DMPK* en el Laboratorio de Neurogenética del CIBN. Los resultados de este trabajo confirman la presencia del microsatélite CTG expandido en 66 de 72 individuos con diagnóstico clínico de DM1.

El método estándar de oro para la genotipificación del microsatélite CTG en el gen *DMPK* es la combinación de la PCR y el Southern blot (Prior, 2009). Debido a las dificultades para la implementación de técnicas tan laboriosas y costosas como el southern blot, se optó por una metodología alternativa basada en PCR y TP-PCR. Aunque esta técnica no permite determinar el número exacto de las repeticiones CTG, su robustez (>99%), sensibilidad (>99%) y especificidad (>99%) al discriminar la presencia o ausencia de la expansión patológica del microsatélite es semejante al estándar de oro (Singh et al., 2014).

Se implementó con éxito la técnica combinada de PCR y TP-PCR utilizando 6 muestras representativas, con modificaciones menores al protocolo original propuesto por Warner et al. (1996). El protocolo optimizado de PCR mostró mayor especificidad y rendimiento empleando la enzima polimerasa Amplitaq Gold 360 y 360 GC Enhancer que el protocolo inicial, esta enzima ha mostrado un alto desempeño en secuencias ricas en GC, el cual mejora aún más empleando el coadyuvante GC 360 Enhancer, lográndose la amplificación de secuencias con un contenido de GC mayor a 70% (<https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4398823>). La enzima polimerasa AmpliTaq® Gold 360 (Applied Biosystems) ha sido empleada en la genotipificación de microsatélites relacionados a diversas enfermedades como la enfermedad de Huntington (Mollersen et al., 2010) y ataxia 36 (García-Murias et al., 2012).

El uso de la PCR bajo condiciones no óptimas ocasiona la producción de grandes cantidades de productos inespecíficos o la ausencia del producto deseado (Innis et al., 2012). Diversos estudios experimentales han demostrado que la adición de coadyuvantes puede mejorar la amplificación de secuencias ricas en GC previniendo la formación de estructuras secundarias y minimizando la alta temperatura de melting de las secuencias ricas en GC durante la PCR (Chakrabarti & Schutt, 2001). Además, la reducción del tiempo de amplificación permitió mejorar la eficiencia de la técnica obteniendo los mismos resultados por la robustez y la alta sensibilidad que posee la técnica de PCR (Bartlett & Stirling, 2003).

La técnica de electroforesis por geles de poliacrilamida presentó, en muchos casos, el efecto “sonrisa” debido al incremento de calor por el efecto Joule (Reid, 1999). Para disminuir el error en la genotipificación de alelos normales se optó por construir dos sets de marcadores que poseían un alelo en común, de modo que sólo se infirieron genotipos en geles que presentaban una migración homogénea del alelo en común en puntos distintos del gel. Los marcadores seleccionados para la inferencia se encontraban en el rango de 5 a 21 repeticiones CTG, incrementando el error en la inferencia de los alelos que se encuentra fuera de este rango. Sin embargo, los alelos normales más frecuentes en diversas poblaciones a nivel del mundo se encuentran en el rango de 5-14 CTG (77-98%) y se encuentran dentro del rango de los marcadores generados (Deka et al., 1996).

El alelo de 55 repeticiones CTG fue el alelo de máxima longitud encontrada por PCR convencional en este estudio; sin embargo, otros autores reportaron la detección de hasta 85 y 150 repeticiones CTG (Dryland et al., 2013; Singh et al., 2014). Esto podría deberse a que el grupo de alelos estudiados no presentaban una longitud mayor a 55 repeticiones CTG en el rango detectable por PCR; sin embargo, con esta técnica

podemos detectar alelos en el rango de pre mutación (35-49 CTG) y de expansiones pequeñas.

El protocolo de TP-PCR, una variación de la PCR convencional, permitió la detección del alelo expandido del microsatélite del gen *DMPK*. La estandarización de la TP-PCR se logró modificando algunos parámetros respecto al protocolo original propuesto por Warner et al. (1996). La TP-PCR utiliza tres cebadores: P₂, que flanquea el microsatélite; P_{4CAG}, que posee una secuencia complementaria al microsatélite; y P_{3R}, que hibridiza a una secuencia complementaria común a la región 5' del cebador P_{4CAG}. En los primeros ciclos de amplificación, la hibridización aleatoria de P_{4CAG} a lo largo del microsatélite genera productos de amplificación de diferentes tamaños. Posteriormente, el cebador P_{3R} hibridiza una secuencia complementaria en los productos finales de amplificación disminuyendo así la inestabilidad inherente a la amplificación de los fragmentos repetitivos (Warner et al., 1996). De este modo, los alelos mayores a 50 CTG poseen un patrón de banda en escalera sobre la marca de referencia de 201pb, mientras que los alelos normales poseen un patrón de bandas menor a la marca de referencia permitiendo la discriminación de los individuos heterocigotos afectados y los individuos homocigotos no afectados, respectivamente.

Se modificó la proporción de los cebadores, ya que con las concentraciones basales no se apreciaban adecuadamente los patrones de bandas sobre la marca de referencia. El aumento de la concentración de P₂ y P_{4CAG} incrementó los productos de amplificación durante la amplificación inicial, mientras que el incremento de la concentración de P_{3R} aumentó la cantidad de los productos finales, enriqueciendo los patrones de bandas sobre la marca de referencia.

El alelo más común en la muestra estudiada es de 13 repeticiones CTG con una frecuencia de 45%, mayor a la encontrada en otras poblaciones (Deka et al., 1996; Theerasasawat et al., 2010). El alelo más frecuente entre diversas poblaciones es el de

5 repeticiones CTG, aunque nuestros resultados son coincidentes con los encontrados en México y Japón (Magaña et al., 2011). En poblaciones donde la prevalencia de DM1 es baja se ha observado una baja frecuencia de alelos mayores a 18CTG (Magaña et al., 2011). La baja frecuencia de alelos mayores a 18 CTG (2.5%) es consistente con un análisis previo en poblaciones amerindias (Zerylnick et al., 1995)

Se encontró un 91.7% de casos DM1 positivos en la muestra estudiada, lo cual es consistente con un alto índice de sospecha clínica de DM1 en base a criterios clínicos como el antecedente familiar de tipo dominante y los signos mayores de DM1: debilidad muscular, miotonía y cataratas. La frecuencia de signos clínicos mayores fue alta en los individuos positivos para DM1. La presencia de cataratas fue característica solamente del 31% de los casos, esto se debería a que en nuestro país aún no existen programas definidos para la atención integral de DM1, y la evaluación oftalmológica no necesariamente incluye el descarte de cataratas en individuos jóvenes, y por ello podría ser subdiagnosticada.

La mayoría de casos DM1 positivos se concentran en el departamento de Lima; sin embargo, existe una significativa contribución de casos procedentes de Cuzco (10.6%) y Puno (9.1%), regiones que poseen poblaciones con un gran componente amerindio. Esto podría sugerir una aparente frecuencia alta de casos en estos grupos, aunque se necesitarían estudios posteriores para evaluar el origen de la mutación.

Se encontró una baja frecuencia de antecedente familiar en los 6 casos negativos para DM1, lo cual sería consistente con formas recesivas o esporádicas de fenocopias de la DM1, como la miotonía congénita, parálisis periódica, miopatía de cuerpo de inclusión, miopatía miofibrilar hereditaria, entre otras que son miopatías distales hereditarias que presentan debilidad muscular progresiva como en la DM1 (Mastaglia & Laing, 1999). Por otro lado, algunas distrofias musculares, pueden presentar fenómenos miotónicos

a lo largo de su evolución, debiendo ser consideradas en el diagnóstico diferencial de síndromes miotónicas con debilidad muscular.

El diagnóstico definitivo de los casos de DM1 es importante, ya que a diferencia de los demás desórdenes musculares, la DM1 se asocia a muchas complicaciones sistémicas que deben vigilarse en el tiempo. La implicancia de este diagnóstico facilita el proceso de asesoramiento genético para estos pacientes, incluyendo información que les permita tomar decisiones de vida como futuras gestaciones.

Existen varias limitaciones en este estudio. En primer lugar, la genotipificación del microsatélite CTG del gen *DMPK* se realizó en geles de poliacrilamida lo cual disminuyó la precisión de la determinación del número de tripletes. Para disminuir los errores en la inferencia de la longitud del alelo del microsatélite *DMPK* empleamos una curva de correlación con un índice de correlación mayor a 0.99 y dos sets de marcadores.

En segundo lugar, el rango reducido de marcadores podría generar un mayor error al genotipificar alelos mayores a 22 repeticiones CTG. Probablemente, los alelos mayores a 50 repeticiones no puedan ser detectados por PCR convencional debido a las limitaciones intrínsecas de esta técnica; sin embargo, la aplicación de TP-PCR puede discriminar la presencia de alelos mayores a 50 repeticiones CTG.

7. CONCLUSIONES

- 7.1. Se implementó una metodología basada en la combinación de las técnicas de PCR y TP-PCR para el diagnóstico molecular de la distrofia miotónica tipo 1 en el Centro de Investigación Básica en Neurogenética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas.
- 7.2. El empleo de esta metodología nos ha permitido confirmar el diagnóstico clínico de DM1 en 66 de 72 pacientes estudiados lo que representa el 91.7% de capacidad de discriminación de los criterios clínicos.
- 7.3. Los 6 casos negativos a DM1, representando al 8.3%, requieren estudios diagnósticos adicionales para descartar fenocopias de DM1.

8. RECOMENDACIONES

- Estandarizar la dirección reversa de la TP-PCR para confirmar la detección del alelo expandido.
- Incrementar el número de marcadores mayores a 21 repeticiones CTG para la genotipificación del alelo normal.
- Realizar la genotipificación del microsatélite CTG del gen *DMPK* empleando un equipo de electroforesis capilar, aún no disponible en muchos laboratorios del país, como el nuestro.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Amorosi, B., Giustini, S., Rossi, A., Giacanelli, M., and Calvieri, S. (1999). Myotonic dystrophy (Steinert disease): a morphologic and biochemical hair study. *Int. J. Dermatol.* 38, 434–438.
- Anvret, M., Ahlberg, G., Grandell, U., Hedberg, B., Johnson, K., and Edström, L. (1993). Larger expansions of the CTG repeat in muscle compared to lymphocytes from patients with myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1397–1400.
- Ashizawa, T., and Wells, R.D. (2006). Chapter 1 - Overview of the Field. In *Genetic Instabilities and Neurological Diseases (Second Edition)*, R.D. Wells, and T. Ashizawa, eds. (Burlington: Academic Press), pp. 3–17.
- Bachinski, L.L., Udd, B., Meola, G., Sansone, V., Bassez, G., Eymard, B., Thornton, C.A., Moxley, R.T., Harper, P.S., Rogers, M.T., et al. (2003). Confirmation of the type 2 myotonic dystrophy (CCTG)_n expansion mutation in patients with proximal myotonic myopathy/proximal myotonic dystrophy of different European origins: a single shared haplotype indicates an ancestral founder effect. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 835–848.
- Barceló, J.M., Mahadevan, M.S., Tsilfidis, C., MacKenzie, A.E., and Korneluk, R.G. (1993). Intergenerational stability of the myotonic dystrophy protomutation. *Hum. Mol. Genet.* 2, 705–709.
- Bartlett, J.M.S., and Stirling, D. (2003). *PCR Protocols* (Springer Science & Business Media).
- Bellini, M., Biagi, S., Stasi, C., Costa, F., Mumolo, M.G., Ricchiuti, A., and Marchi, S. (2006). Gastrointestinal manifestations in myotonic muscular dystrophy. *World J. Gastroenterol. WJG* 12, 1821–1828.
- Bird, T.D. (1993). Myotonic Dystrophy Type 1. In *GeneReviews*(®), R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J. Bean, T.D. Bird, C.R. Dolan, C.-T. Fong, R.J. Smith, et al., eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle),.
- Bonifazi, E., Gullotta, F., Vallo, L., Iraci, R., Nardone, A.M., Brunetti, E., Botta, A., and Novelli, G. (2006). Use of RNA fluorescence in situ hybridization in the prenatal molecular diagnosis of myotonic dystrophy type I. *Clin. Chem.* 52, 319–322.

Brook, J.D., McCurrach, M.E., Harley, H.G., Buckler, A.J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V.P., Thirion, J.P., and Hudson, T. (1992). Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 68, 799–808.

Brunner, H.G., Bruggenwirth, H.T., Nillesen, W., Jansen, G., Hamel, B.C.J., Hoppe, R.L.E., de Die, C.E.M., Howeler, C.J., van Oost, B.A., Wieringa, B., et al. (1993). Influence of sex of the transmitting parent as well as of parental allele site on the CTG expansion in myotonic dystrophy (DM). *Am. J. Hum. Genet.* 53, 1016–1023.

Chakrabarti, R., and Schutt, C.E. (2001). The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones. *Gene* 274, 293–298.

Charlet-B, N., Savkur, R.S., Singh, G., Philips, A.V., Grice, E.A., and Cooper, T.A. (2002). Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol. Cell* 10, 45–53.

CIBN, Centro de Investigación Básica en Neurogenética. (2014). Informe anual de actividades 2014.

Cobo, A.M., Poza, J.J., Blanco, A., Munain, A.L. de, Saénz, A., Azpitarte, M., Marchessi, J., and Massó, J.F.M. (1996). Frequency of myotonic dystrophy gene carriers in cataract patients. *J. Med. Genet.* 33, 221–223.

Davies, P.A., and Gray, G. (2002). Long-Range PCR. In *PCR Mutation Detection Protocols*, B.D.M. Theophilus, and R. Rapley, eds. (Humana Press), pp. 51–55.

Davis, B.M., McCurrach, M.E., Taneja, K.L., Singer, R.H., and Housman, D.E. (1997). Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 7388–7393.

De Die-Smulders (2000). Long-Term clinical and genetic studies in myotonic dystrophy.

Deka, R., Majumder, P.P., Shriver, M.D., Stivers, D.N., Zhong, Y., Yu, L.M., Barrantes, R., Yin, S.J., Miki, T., Hundrieser, J., et al. (1996). Distribution and evolution of CTG repeats at the myotonin protein kinase gene in human populations. *Genome Res.* 6, 142–154.

De Swart, B.J.M., van Engelen, B.G.M., van de Kerkhof, J.P.B.M., and Maassen, B.A.M. (2004). Myotonia and flaccid dysarthria in patients with adult onset myotonic dystrophy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75, 1480–1482.

Dhaenens, C.M., Tran, H., Frandemiche, M.-L., Carpentier, C., Schraen-Maschke, S., Sistiaga, A., Goicoechea, M., Eddarkaoui, S., Van Brussels, E., Obriot, H., et al. (2011). Mis-splicing of Tau exon 10 in myotonic dystrophy type 1 is reproduced by overexpression of CELF2 but not by MBNL1 silencing. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1812, 732–742.

Douniol, M., Jacquette, A., Cohen, D., Bodeau, N., Rachidi, L., Angeard, N., Cuisset, J.-M., Vallée, L., Eymard, B., Plaza, M., et al. (2012). Psychiatric and cognitive phenotype of childhood myotonic dystrophy type 1. *Dev. Med. Child Neurol.* 54, 905–911.

Dryland, P.A., Doherty, E., Love, J.M., and Love, D.R. (2013). Simple Repeat-Primed PCR Analysis of the *Myotonic Dystrophy Type 1* Gene in a Clinical Diagnostics Environment. *J. Neurodegener. Dis.* 2013, e857564.

Fardaei, M., Rogers, M.T., Thorpe, H.M., Larkin, K., Hamshere, M.G., Harper, P.S., and Brook, J.D. (2002). Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum. Mol. Genet.* 11, 805–814.

Fu, Y.H., Friedman, D.L., Richards, S., Pearlman, J.A., Gibbs, R.A., Pizzuti, A., Ashizawa, T., Perryman, M.B., Scarlato, G., and Fenwick, R.G.J. (1993). Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. *Science* 260, 235–238.

Fu, Y.H., Pizzuti, A., Fenwick, R.G.J., King, J., Rajnarayan, S., Dunne, P.W., Dubel, J., Nasser, G.A., Ashizawa, T., and de Jong, P. (1992). An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 255, 1256–1258.

García-Murias, M., Quintáns, B., Arias, M., Seixas, A.I., Cacheiro, P., Tarrío, R., Pardo, J., Millán, M.J., Arias-Rivas, S., Blanco-Arias, P., et al. (2012). “Costa da Morte” ataxia is spinocerebellar ataxia 36: clinical and genetic characterization. *Brain* 135, 1423–1435.

Gennarelli, M., Novelli, G., Andreasi Bassi, F., Martorell, L., Cornet, M., Menegazzo, E., Mostacciolo, M.L., Martinez, J.M., Angelini, C., Pizzuti, A., et al. (1996). Prediction of myotonic dystrophy clinical severity based on the number of intragenic [CTG]_n trinucleotide repeats. *Am. J. Med. Genet.* 65, 342–347.

- Goers, E.S., Purcell, J., Voelker, R.B., Gates, D.P., and Berglund, J.A. (2010). MBNL1 binds GC motifs embedded in pyrimidines to regulate alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 38, 2467–2484.
- Goldman, A., Krause, A., Ramsay, M., and Jenkins, T. (1996). Founder effect and prevalence of myotonic dystrophy in South Africans: molecular studies. *Am. J. Hum. Genet.* 59, 445–452.
- Gomes-Pereira, M., Bidichandani, S.I., and Monckton, D.G. (2004). Analysis of Unstable Triplet Repeats Using Small-Pool Polymerase Chain Reaction. In *Trinucleotide Repeat Protocols*, (New Jersey: Humana Press), pp. 061–076.
- Harley, H.G., Rundle, S.A., MacMillan, J.C., Myring, J., Brook, J.D., Crow, S., Reardon, W., Fenton, I., Shaw, D.J., and Harper, P.S. (1993). Size of the unstable CTG repeat sequence in relation to phenotype and parental transmission in myotonic dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 52, 1164–1174.
- Harmon, E.B., Harmon, M.L., Larsen, T.D., Paulson, A.F., and Perryman, M.B. (2008). Myotonic dystrophy protein kinase is expressed in embryonic myocytes and is required for myotube formation. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 237, 2353–2366.
- Harper, P.S. (1975). Congenital myotonic dystrophy in Britain. I. Clinical aspects. *Arch. Dis. Child.* 50, 505–513.
- Harvey, B., and Soundy, P. (2005). Southern Blotting as a Diagnostic Method. In *Medical Biomethods Handbook*, J.M. Walker, and R. Rapley, eds. (Humana Press), pp. 35–42.
- Hilbert, J.E., Ashizawa, T., Day, J.W., Luebbe, E.A., Martens, W.B., McDermott, M.P., Tawil, R., Thornton, C.A., and Moxley, R.T. 3rd (2013). Diagnostic odyssey of patients with myotonic dystrophy. *J. Neurol.*
- Höweler, C.J., Busch, H.F., Geraedts, J.P., Niermeijer, M.F., and Staal, A. (1989). Anticipation in myotonic dystrophy: fact or fiction? *Brain J. Neurol.* 112 (Pt 3), 779–797.
- Hsiao, K.M., Chen, S.S., Li, S.Y., Chiang, S.Y., Lin, H.M., Pan, H., Huang, C.C., Kuo, H.C., Jou, S.B., Su, C.C., et al. (2003). Epidemiological and Genetic Studies of Myotonic Dystrophy Type 1 in Taiwan. *Neuroepidemiology* 22, 283–289.
- IDMC, T.I.M.D.C. (2000). New nomenclature and DNA testing guidelines for myotonic dystrophy type 1 (DM1). *Neurology* 54, 1218–1221.

Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., and White, T.J. (2012). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press).

Jansen, G., Bächner, D., Coerwinkel, M., Wormskamp, N., Hameister, H., and Wieringa, B. (1995). Structural organization and developmental expression pattern of the mouse WD-repeat gene DMR-N9 immediately upstream of the myotonic dystrophy locus. *Hum. Mol. Genet.* 4, 843–852.

Kim, W.B., Jeong, J.Y., Doo, S.W., Yang, W.J., Song, Y.S., Lee, S.R., Park, J.W., and Kim, D.W. (2012). Myotonic dystrophy type 1 presenting as male infertility. *Korean J. Urol.* 53, 134–136.

Kimura, T., Nakamori, M., Lueck, J.D., Pouliquin, P., Aoike, F., Fujimura, H., Dirksen, R.T., Takahashi, M.P., Dulhunty, A.F., and Sakoda, S. (2005). Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2189–2200.

Kumar, A., Agarwal, S., Agarwal, D., and Phadke, S.R. (2013). Myotonic dystrophy type 1 (DM1): A triplet repeat expansion disorder. *Gene* 522, 226–230.

Kuyumcu-Martinez, N.M., Wang, G.-S., and Cooper, T.A. (2007). Increased steady state levels of CUGBP1 in Myotonic Dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol. Cell* 28, 68–78.

Ladd, A.N., Charlet-B., N., and Cooper, T.A. (2001). The CELF Family of RNA Binding Proteins Is Implicated in Cell-Specific and Developmentally Regulated Alternative Splicing. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1285–1296.

Lavedan, C., Hofmann-Radvanyi, H., Shelbourne, P., Rabes, J.P., Duros, C., Savoy, D., Dehaupas, I., Luce, S., Johnson, K., and Junien, C. (1993). Myotonic dystrophy: size- and sex-dependent dynamics of CTG meiotic instability, and somatic mosaicism. *Am. J. Hum. Genet.* 52, 875–883.

Lopez de Munain, A., Cobo, A.M., Poza, J.J., Navarrete, D., Martorell, L., Palau, F., Emparanza, J.I., and Baiget, M. (1995). Influence of the sex of the transmitting grandparent in congenital myotonic dystrophy. *J. Med. Genet.* 32, 689–691.

Magaña, J.J., Cortés-Reynosa, P., Escobar-Cedillo, R., Gómez, R., Leyva-García, N., and Cisneros, B. (2011). Distribution of CTG repeats at the DMPK gene in myotonic

dystrophy patients and healthy individuals from the Mexican population. *Mol. Biol. Rep.* 38, 1341–1346.

Mastaglia, F.L., and Laing, N.G. (1999). Distal myopathies: clinical and molecular diagnosis and classification. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 67, 703–707.

Michalowski, S., Miller, J.W., Urbinati, C.R., Paliouras, M., Swanson, M.S., and Griffith, J. (1999). Visualization of double-stranded RNAs from the myotonic dystrophy protein kinase gene and interactions with CUG-binding protein. *Nucleic Acids Res.* 27, 3534–3542.

Mladenovic, J., Pekmezovic, T., Todorovic, S., Rakocevic-Stojanovic, V., Savic, D., Romac, S., and Apostolski, S. (2006). Epidemiology of myotonic dystrophy type 1 (Steinert disease) in Belgrade (Serbia). *Clin. Neurol. Neurosurg.* 108, 757–760.

Møllersen, L., Rowe, A.D., Larsen, E., Rognes, T., and Klungland, A. (2010). Continuous and Periodic Expansion of CAG Repeats in Huntington's Disease R6/1 Mice. *PLoS Genet* 6, e1001242.

Moxley, R.T., Corbett, A.J., Minaker, K.L., and Rowe, J.W. (1984). Whole body insulin resistance in myotonic dystrophy. *Ann. Neurol.* 15, 157–162.

Mussini, I., Biral, D., Marin, O., Furlan, S., and Salvatori, S. (1999). Myotonic dystrophy protein kinase expressed in rat cardiac muscle is associated with sarcoplasmic reticulum and gap junctions. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 47, 383–392.

Napierala, M., and Krzyzosiak, W.J. (1997). CUG Repeats Present in Myotonin Kinase RNA Form Metastable “Slippery” Hairpins. *J. Biol. Chem.* 272, 31079–31085.

Norwood, F.L.M., Harling, C., Chinnery, P.F., Eagle, M., Bushby, K., and Straub, V. (2009). Prevalence of genetic muscle disease in Northern England: in-depth analysis of a muscle clinic population. *Brain* 132, 3175–3186.

Otten, A.D., and Tapscott, S.J. (1995). Triplet repeat expansion in myotonic dystrophy alters the adjacent chromatin structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 5465–5469.

Pelargonio, G., Russo, A.D., Sanna, T., Martino, G.D., and Bellocci, F. (2002). Myotonic Dystrophy and The. *Heart* 88, 665–670.

Philips, A.V., Timchenko, L.T., and Cooper, T.A. (1998). Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* 280, 737–741.

- Prior, T.W. (2009). Technical standards and guidelines for myotonic dystrophy type 1 testing. *Genet. Med.* 11, 552–555.
- Reardon, W., Newcombe, R., Fenton, I., Sibert, J., and Harper, P.S. (1993). The natural history of congenital myotonic dystrophy: mortality and long term clinical aspects. *Arch. Dis. Child.* 68, 177–181.
- Reid, R. (1999). *Peptide and Protein Drug Analysis* (CRC Press).
- Romeo, V. (2012). Myotonic Dystrophy Type 1 or Steinert's disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 724, 239–257.
- Rutherford, M.A., Heckmatt, J.Z., and Dubowitz, V. (1989). Congenital myotonic dystrophy: respiratory function at birth determines survival. *Arch. Dis. Child.* 64, 191–195.
- Savkur, R.S., Philips, A.V., and Cooper, T.A. (2001). Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat. Genet.* 29, 40–47.
- Segel, R., Silverstein, S., Lerer, I., Kahana, E., Meir, R., Sagi, M., Zilber, N., Korczyn, A.D., Shapira, Y., Argov, Z., et al. (2003). Prevalence of myotonic dystrophy in Israeli Jewish communities: Inter-community variation and founder premutations. *Am. J. Med. Genet. A.* 119A, 273–278.
- Shelbourne, P., Winqvist, R., Kunert, E., Davies, J., Leisti, J., Thiele, H., Bachmann, H., Buxton, J., Williamson, B., and Johnson, K. (1992). Unstable DNA may be responsible for the incomplete penetrance of the myotonic dystrophy phenotype. *Hum. Mol. Genet.* 1, 467–473.
- Siciliano, G., Manca, M., Gennarelli, M., Angelini, C., Rocchi, A., Iudice, A., Miorin, M., and Mostacciuolo, M. (2001). Epidemiology of myotonic dystrophy in Italy: re-appraisal after genetic diagnosis. *Clin. Genet.* 59, 344–349.
- Singh, S., Zhang, A., Dlouhy, S., and Bai, S. (2014). Detection of large expansions in myotonic dystrophy type 1 using triplet primed PCR. *Front. Genet.* 5.
- Skrzypczak-Zielinska, M., Sulek-Piatkowska, A., Mierzejewski, M., and Froster, U.G. (2009). New analysis method of myotonic dystrophy 1 based on quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Genet. Test. Mol. Biomark.* 13, 651–655.

Strachan, T., and Read, A.P. (1999a). Nucleic acid hybridization assays.

Strachan, T., and Read, A.P. (1999b). Cell-based DNA cloning.

Suominen, T., Bachinski, L.L., Auvinen, S., Hackman, P., Baggerly, K.A., Angelini, C., Peltonen, L., Krahe, R., and Udd, B. (2011). Population frequency of myotonic dystrophy: higher than expected frequency of myotonic dystrophy type 2 (DM2) mutation in Finland. *Eur. J. Hum. Genet.* 19, 776–782.

Taneja, K.L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D., and Singer, R.H. (1995). Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J. Cell Biol.* 128, 995–1002.

Tapscott, S.J. (2000). Deconstructing myotonic dystrophy. *Science* 289, 1701–1702.

Theerasasawat, S., Papsing, C., and Pulkes, T. (2010). CTG repeat lengths of the DMPK gene in myotonic dystrophy patients compared to healthy controls in Thailand. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 17, 1520–1522.

Timchenko, N.A., Cai, Z.J., Welm, A.L., Reddy, S., Ashizawa, T., and Timchenko, L.T. (2001). RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J. Biol. Chem.* 276, 7820–7826.

Tsilfidis, C., MacKenzie, A.E., Mettler, G., Barceló, J., and Korneluk, R.G. (1992). Correlation between CTG trinucleotide repeat length and frequency of severe congenital myotonic dystrophy. *Nat. Genet.* 1, 192–195.

Turner, C., and Hilton-Jones, D. (2010). The myotonic dystrophies: diagnosis and management. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 81, 358–367.

Udd, B., and Krahe, R. (2012). The myotonic dystrophies: molecular, clinical, and therapeutic challenges. *Lancet Neurol.* 11, 891–905.



Umemoto, G., Nakamura, H., Tsukiyama, Y., Koyano, K., and Kikuta, T. (2007). The Relationship between Masticatory Function and Dysphagia in Patients with Myotonic Dystrophy. *Prosthodont. Res. Pract.* 6, 109–113.

Warner, J.P., Barron, L.H., Goudie, D., Kelly, K., Dow, D., Fitzpatrick, D.R., and Brock, D.J. (1996). A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. *J. Med. Genet.* 33, 1022–1026.

- Whittaker, R.G., Ferenczi, E., and Hilton-Jones, D. (2006). Myotonic dystrophy: practical issues relating to assessment of strength. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 77, 1282–1283.
- Winchester, C.L., Ferrier, R.K., Sermoni, A., Clark, B.J., and Johnson, K.J. (1999). Characterization of the expression of DMPK and SIX5 in the human eye and implications for pathogenesis in myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 8, 481–492.
- Wong, L.J., Ashizawa, T., Monckton, D.G., Caskey, C.T., and Richards, C.S. (1995). Somatic heterogeneity of the CTG repeat in myotonic dystrophy is age and size dependent. *Am. J. Hum. Genet.* 56, 114–122.
- Yotova, V., Labuda, D., Zietkiewicz, E., Gehl, D., Lovell, A., Lefebvre, J.-F., Bourgeois, S., Lemieux-Blanchard, É., Labuda, M., Vézina, H., et al. (2005). Anatomy of a founder effect: myotonic dystrophy in Northeastern Quebec. *Hum. Genet.* 117, 177–187.
- Yum, M.-S., Lee, B.H., Kim, G.-H., Lee, J.-J., Choi, S.H., Lee, J.Y., Kim, J.-M., Kim, Y.-M., Ko, T.-S., and Yoo, H.-W. (2013). Southern Analysis after Long-range PCR: Clinical Application in Korean Patients with Myotonic Dystrophy 1. *J. Genet. Med.* 10, 33.
- Zellweger, H., and Ionasescu, V. (1973). Myotonic Dystrophy and its Differential Diagnosis. *Acta Neurol. Scand.* 49, 1–28.
- Zerylnick, C., Torroni, A., Sherman, S.L., and Warren, S.T. (1995). Normal variation at the myotonic dystrophy locus in global human populations. *Am. J. Hum. Genet.* 56(1), 123–130.

10. ANEXOS



ANEXO 1. Metodología convencional de extracción de ADN por salting-out implementado en el CIBN-INCN.

	PERÚ Ministerio de Salud	INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLÓGICAS		Pág. 332
Versión: 1.0		Guía de Procedimientos Médicos del Servicio de Neurogenética Departamento de Investigación, Docencia y Apoyo al Diagnóstico en Neuropatología.		

CÓDIGO N° PEL-01	PROCEDIMIENTO: EXTRACCIÓN DE ADN DE LINFOCITOS
OBJETIVO	Estandarizar extracción de ADN de linfocitos, paso inicial fundamental para almacenamiento en Biobanco y para procedimientos de diagnóstico molecular
ALCANCE	A todo el personal que labora en el Laboratorio de Neurogenética del INCN
MUESTRA	Sangre venosa periférica
MATERIALES Y EQUIPOS	1. Centrífuga de tubos 2. Incubadora 3. Tubos Falcón de 50 ml 4. Micropipetas de 1000 ml 5. Tapa de 1000 ml 6. Guantes 7. Mascara 8. Gorro 9. Mandilón
REACTIVOS	1. BUFFER DE LISIS DE GLÓBULOS ROJOS (Trizma base 10uM, NaCl 10uM, MgCl 5uM). Trizma base 2M, pH7.5.....5 ml MgCl 1M.....5 ml NaCl 3M.....3.3 ml Enraizar hasta un volumen de 1000 ml con agua bidestilada 2. PROTEINASA K 0.2 mg/ml Trizma HCl 2M pH 8.0.....0.25 ml EDTA 0.5M pH 8.0.....0.5 ml SDS 10%.....1 ml NaCl 3M.....3.33 ml Proteinasa K 10mg/ml.....0.5 ml Enraizar hasta 50 ml con agua bidestilada 3. PREPARACIÓN DEL TE LOW (Tris HCl 50mM pH8, EDTA 1mM) Tris HCl 1M pH 8.....5 ml EDTA 0.5M pH 8.....200 ul Enraizar hasta 100 ml con agua bidestilada

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO	
1	Colectar 10 ml de sangre humana de una vena periférica en tubos al vacío, conteniendo EDTA (tapa violeta).
2	La muestra se divide en dos y se procesa en paralelo como sigue.
3	Transferir 5 ml de sangre a un tubo de vidrio estéril de 13 cm con tapa rosca.
4	Adicionar 13 ml de buffer de lisis y homogenizar suavemente por 20 minutos.
5	Centrifugar a 3500 r.p.m. por 20 minutos.
6	Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet con 13 ml de buffer lisis.
7	Homogenizar suavemente por 5 minutos.
8	Centrifugar a 3500 r.p.m. por 20 minutos y eliminar el sobrenadante 8. Resuspender el pellet en 0.5 ml de proteinasa K 0.2 mg/ml.
9	Dejar la muestra a 37 °C por 24 horas.
10	Resuspender el ADN con etanol absoluto helado.
11	Retirar el ADN, dejar secar a medio ambiente por unas horas.
12	Resuspender el ADN en 500 ul de TE LOW.
13	Guardar el ADN resuspendido a - 20 °C.

ELABORADO:	REVISADO:	APROBADO:	VIGENCIA:
SNG	DEPE	DEIDAEADT	2011 /2012

	PERÚ Ministerio de Salud	INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS NEUROLÓGICAS		Pág.333
Versión : 1.0		Guía de Procedimientos Médicos del Servicio de Neurogenética Departamento de Investigación, Docencia y Apoyo al Diagnóstico en Neuropatología.		

14	Se obtienen dos tubos con muestra de ADN al final del procedimiento y se almacenan a menos 20 grados centígrados, para emplearse de acuerdo a necesidad.
----	--

RECOMENDACIONES	<ul style="list-style-type: none"> El proceso de extracción de ADN se debe dar en un ambiente limpio y libre de contaminantes como DNasa, RNasa y ADN que no correspondan a las muestras trabajadas por lo que es importante limpiar escrupulosamente el ambiente de trabajo: emplear lejía al 10% y luz ultra-violeta. Emplear mandílnes, gorros, mascarillas y guantes durante el proceso, los cuales deberán estar limpios para evitar la contaminación de la muestra. No realizar otras actividades que no correspondan durante el proceso de extracción de ADN.
DURACIÓN	3 horas
DEFINICIONES Glosario de términos	<p>•ADN: Abreviatura de ácido desoxirribonucleico (en inglés deoxyribonucleic acid o DNA). Es la molécula que contiene y transmite la información genética de los organismos excepto en algunos tipos de virus (retrovirus). Está formada por dos cadenas complementarias de nucleótidos que se enrollan entre sí formando una doble hélice que se mantiene unida por enlaces de hidrógeno entre bases complementarias. Los cuatro nucleótidos que forman el ADN contienen las bases adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). Dado que en el ADN la adenina se empareja solo con la timina y la citosina solo con la guanina, cada cadena del ADN puede ser empleada como molde para fabricar su complementaria.</p> <p>•BUFFER LISIS: Solución hipotónica que permite la hemólisis de los glóbulos rojos.</p>

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
<ul style="list-style-type: none"> Miller SA, Dykes DD, Polasky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nuc. Acids Res. 1988; 16:1215

ELABORADO:	REVISADO:	APROBADO:	VIGENCIA:
SN3	GEPE	DEIDAEADT	2011.09/12

ANEXO 2. Preparación de soluciones.

POLIACRILAMIDA 21%

Acrilamida.....1 g
Bisacrilamida..... 20 g
Enrazar con H₂O_{ddd} hasta 100 mL.

TBE 10X

Tris..... 54 g
Ácido Bórico..... 27.5 g
EDTA 0.5 M pH 8.0..... 20 mL
Enrazar con H₂O_{ddd} hasta 500 mL.

POLIACRILAMIDA AL 8%

Poliacrilamida 21%..... 8 mL
TBE 10X..... 2.1 mL
H₂O_{ddd}..... 10.9 mL

TBE 1X

TBE 10X..... 100 mL
H₂O_{ddd}..... 900 mL

SOLUCIÓN A

Ácido acético..... 1 mL
Álcohol absoluto..... 10 mL
Enrazar con H₂O_{ddd} hasta 150 mL.

SOLUCIÓN B

Nitrato de plata..... 0.3 g
Enrazar con H₂O_{ddd} hasta 150 mL.

SOLUCIÓN C

Hidróxido de sodio..... 3 g
Formaldehído 37% 1 mL
Enrazar con H₂O_{ddd} hasta 150 mL.

BUFFER DE SIEMBRA 4X

Xilencianol0.25 mg
Azul de Bromofenol.....0.25 mg
Glicerol.....3 mL
Enrazar con H₂O_{ddd} hasta 10 mL.

ANEXO 3. Certificado de aprobación ética N° 065-2014-CIEI-INCN otorgado por el
Comité Institucional de ética en Investigación del INCN



PERU

MINISTERIO DE
SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS NEUROLÓGICAS

"Año de la Promoción de la Industria Responsable y
Compromiso Climático"



Comité de Ética

COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN.

Presidenta

Dra. María Meza Vega

Miembros Titulares

Dr. Guido Albán Zapata

Dra. Peggy C. Martínez Esteban

Lic. Sor Marilley Ríos Dávila

Mag. Nestor Flores Rodríguez

Abog. Luz M. Marín Sernadas

Lic. Esther Gallardo Santamaría

Secretaria

Aída P. Llamas Colonio

CERTIFICADO DE APROBACIÓN ETICA

N° 065 -2014-CIEI -INCN

El Comité Institucional de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, ha revisado y Aprobado por unanimidad el proyecto de investigación: **"Implementación de una metodología basada en la combinación de las técnicas de PCR y TP-PCR para el diagnóstico molecular de la Distrofia Miotónica Tipo 1 en el Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas en el año 2014"** presentado por la investigadora, Ana Karina Milla Neyra

El Comité Institucional de Ética en Investigación realizará una visita durante la ejecución del estudio para ver las condiciones del lugar donde se realizará la investigación y el desarrollo de la misma.

La vigencia del estudio regirá por el período de un año, a partir de la fecha de expedición del presente Certificado, cumpliendo el investigador principal con realizar un informe trimestral y final del estudio.

Lima, 12 de agosto del 2014.

MINISTERIO DE SALUD
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
[Firma]
Dra. MARÍA MEZA VEGA
Presidenta del Comité Institucional de
Ética en Investigación

MMV/pllc

www.icn.minsa.gob.pe
iecn@icn.minsa.gob.pe

Jr. Ancash 1271 Barrios Altos,
Lima 1 Perú.
Telefax (511) 4117762.

ANEXO 4: Ficha de consentimiento de participación en investigación



MINISTERIO DE SALUD
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Servicio de Neurogenética

REGISTRO N°

CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACIÓN EN INVESTIGACIÓN

INVESTIGADORES:

Somos miembros del Centro de Investigación en Neurogenética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN), con dirección en Jr. Ancash 1271, Lima, teléfono 411-7779. Atendemos en horario de 8 am a 12 pm de lunes a viernes.

- Médica neuróloga Pilar Elena Mazzetti Soler, jefa del Servicio
- Médico neurólogo Mario Reynaldo Cornejo Olivas, neurogenetista del Servicio
- Ingeniera María Victoria Marca Ysabel, responsable del laboratorio del Servicio
- Biólogo Gerardo Olimpio Ortega Dávila, genetista del Servicio.
- Biólogo Saúl Demetrio Lindo Samanamud, investigador asociado del Servicio

En nuestro trabajo, nos guiamos por la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos de la UNESCO, aprobada en 1997; la Declaración Internacional sobre los Datos Genéticos Humanos de la UNESCO, aprobada el 16 de Octubre del 2003; el Informe de la Secretaría de la Organización Mundial de la Salud sobre Control de las Enfermedades Genéticas, Documento EB116/3 del 21 de Abril de 2005 y la Comunicación 679 de la Comisión de las Comunidades Europeas sobre las Enfermedades Raras: un Reto para Europa del 11 de Noviembre del 2008. Igualmente, todos los integrantes del Servicio firmamos una Declaración de Confidencialidad, con respecto a los datos que manejamos durante nuestro trabajo.

Le INVITAMOS a participar en estudios de investigación. El propósito de este documento es brindarle información que pueda necesitar para decidir **VOLUNTARIAMENTE** si participa o no. Por favor revise este documento cuidadosamente, puede hacer todas las preguntas que considere necesarias para decidir sobre su participación. Siéntase en libertad de comentar con amigos y familiares sobre este tema. Si decide participar recuerde que le entregaremos una copia firmada de este documento.

¿Qué estamos investigando?

Nuestro Servicio tiene como área de investigación las enfermedades hereditarias del sistema nervioso, enfermedades consideradas como raras y de las que se conoce poco en nuestro país. Nos encontramos recogiendo información de las familias y personas afectadas por estas enfermedades; así como de personas sanas para realizar comparaciones; con la finalidad de conocerlas mejor y poder organizar así la atención en nuestro país y en el Instituto. Igualmente, esta información le puede servir a su médico tratante para aclarar la enfermedad, guiarlo mejor y para otros familiares que pueden ver así orientado el diagnóstico.

¿Cómo será su participación en investigación?

- Le preguntaremos sobre algunas molestias o síntomas, tanto en Usted como en algunos miembros de su familia. Esta información clínica será registrada por un clínico del servicio.
- Se le realizará una entrevista y se le tomará una muestra de sangre en cantidad de 15 mililitros que corresponde a tres cucharadas de sopa aproximadamente, lo que constituye una cantidad pequeña en comparación el volumen de sangre que tenemos (tenemos 3 y medio litros aproximadamente).
- De la muestra de sangre obtenida se extraerá una sustancia llamada ADN, que será utilizada para analizar varios genes relacionados con enfermedades neurológicas con base genética



MINISTERIO DE SALUD
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Servicio de Neurogenética

¿Es posible guardar su muestra de ADN en forma permanente y seguir investigando con ella?

Sí, la muestra de ADN obtenida a partir de su sangre podría ser guardada en el Banco de ADN del Instituto para su uso en investigación de aspectos relacionados a estas enfermedades. Si así lo desea, le informaremos sobre nuevos estudios de investigación y así decidir su participación en estudios futuros relacionados a su enfermedad.

¿Cuáles son los beneficios de participar con su muestra en investigación?

Su participación permitirá tener mayor información sobre su enfermedad, organizar su cuidado y brindar información que podría aportar en la búsqueda de futuros tratamientos para su enfermedad. No hay un beneficio directo para Ud., únicamente ayudarnos a mejorar su cuidado. No habrá compensación alguna por su participación.

¿Las personas sanas también podemos ayudar en investigación?

Sí. Ud. puede participar como control sano y ello nos permitirá comparar la genética de las personas sanas con las afectadas para ayudarnos a aclarar diversos aspectos de estas enfermedades.

¿Cuáles son las molestias y riesgos de participar en investigación genética?

Las molestias que Ud. sentirá son algo de dolor por el pinchazo de la aguja y rara vez podría presentar un moretón en el área donde se le introdujo la aguja o bien una infección en la zona de punción. En este último caso, será atendido por un personal de la institución sin costo adicional. No es posible conservar totalmente la confidencialidad de su información genética, ya que en el futuro la información del ADN podría ser utilizada para desarrollar otros procedimientos como terapia génica, diseño de medicamentos, estudios de origen de nuestra población, etc.

¿Si decide participar en investigación, son confidenciales los datos de los estudios?

Si decide participar en investigación, todos los hallazgos en estos estudios serán confidenciales, es decir sus datos serán mantenidos en secreto. Sus datos personales así como la muestra de sangre tendrán un código y no su nombre. Si los resultados de estos estudios son publicados en revistas o libros de medicina, o presentados en eventos científicos, su nombre no aparecerá.

¿Qué pasaría si decide no participar en investigación?

Su participación es voluntaria y si decide no participar, esto no afectará de ninguna manera la atención de salud que Ud. recibe, que seguirá siendo la misma y a cargo de sus mismos médicos.

¿Qué pasaría si decide retirarse de la investigación?

En cualquier momento Ud. puede retirarse (revocar) su consentimiento o autorización para participar en investigación. Igualmente, ello no cambia su atención en este Servicio por sus médicos. Ud. nos puede avisar sobre su decisión y luego firmar en este mismo consentimiento o autorización la parte que indica que ya no desea seguir participando.

¿En caso de tener preguntas en relación al estudio con quien podría contactar?

Si tuviese preguntas adicionales durante el estudio dirigirse a:

- Equipo de Neurogenética (Pilar Mazzetti, Mario Cornejo, Victoria Marca, Olimpio Ortega, Saúl Lindo) Jr. Ancash 1271, Lima, teléfono 411-7779



MINISTERIO DE SALUD
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Servicio de Neurogenética

DECLARACIÓN DEL PARTICIPANTE

He sido informado(a) acerca de los beneficios y limitaciones de participar en investigación y he tenido la oportunidad de hacer las preguntas necesarias; estoy satisfecho(a) con las explicaciones recibidas y doy voluntariamente mi consentimiento para:

1. Que se me extraiga una muestra de sangre para investigación para: a. Enfermedad de..... () b. Control sano para investigación en enfermedades neurológicas con base genética ()	Huella digital
2. Que (SI/NO) se guarde mi muestra en el Banco de ADN del Instituto	
3. Que (SI/NO) se me contacte en el futuro para autorizar el uso de mi muestra en investigaciones específicas sobre la enfermedad.....(solo para personas afectadas)	

PARTICIPANTE

Nombre completo

.....

.....

Firma

.....

Fecha y hora.....

TESTIGO

Nombre completo

.....

.....

Firma

.....

Fecha y hora.....

Investigador que toma el consentimiento:

Firma:

Fecha y hora:

Si el solicitante no está capacitado para dar su consentimiento

Yo, como representante legal autorizado y/o familiar responsable del solicitante y consentimiento para participar en investigación.

Nombre completo:

Firma:

Fecha y hora:

Revocatoria (retiro) del Consentimiento:

Nombre completo

Firma

Fecha y hora:

ANEXO 5: Ficha de compromiso de confidencialidad

Yo,

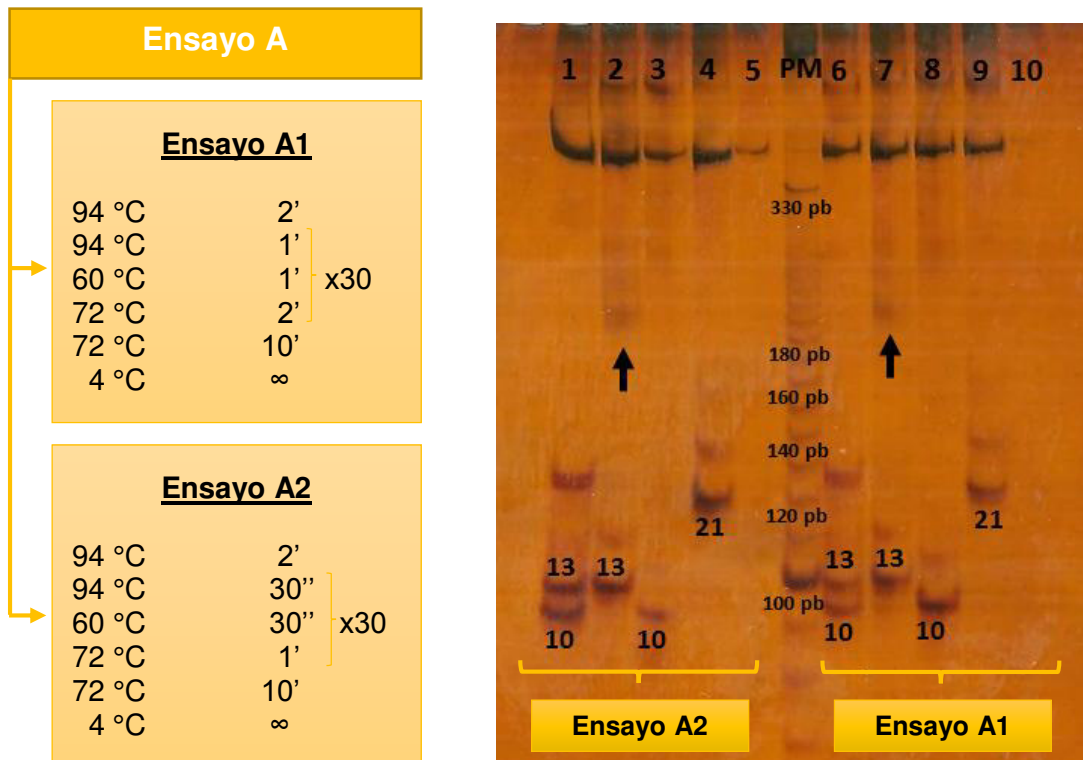
_____, con DNI No. _____, en mi condición de _____, trabajo/asisto/hago una rotación en el Servicio y Laboratorio de Neurogenética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, desde el _____ hasta el _____.

Desde el inicio de mi trabajo y en adelante, sin importar en que Institución o dependencia trabaje, me comprometo a guardar confidencialidad y no divulgar bajo cualquier forma de difusión, la información que tenga que manejar como parte de mi permanencia en el Servicio y Laboratorio, incluyendo nombres de las personas e identificación de las familias a las que pertenecen, resultados clínicos y moleculares encontrados, contenido de la consejería genética y otros no directamente especificados en este documento pero que pongan en riesgo la confidencialidad debida a las personas directa o indirectamente afectadas que acuden para atención. Igualmente, me comprometo a guardar confidencialidad bajo las mismas características antes mencionadas, con respecto a las bases de datos y técnicas moleculares que se emplean en el Servicio y Laboratorio y los resultados clínico moleculares disponibles, y a no modificar ni copiar las bases de datos, protocolos clínicos o técnicos y resultados antes mencionados.

Barrios Altos, _____ de _____ del 2014.

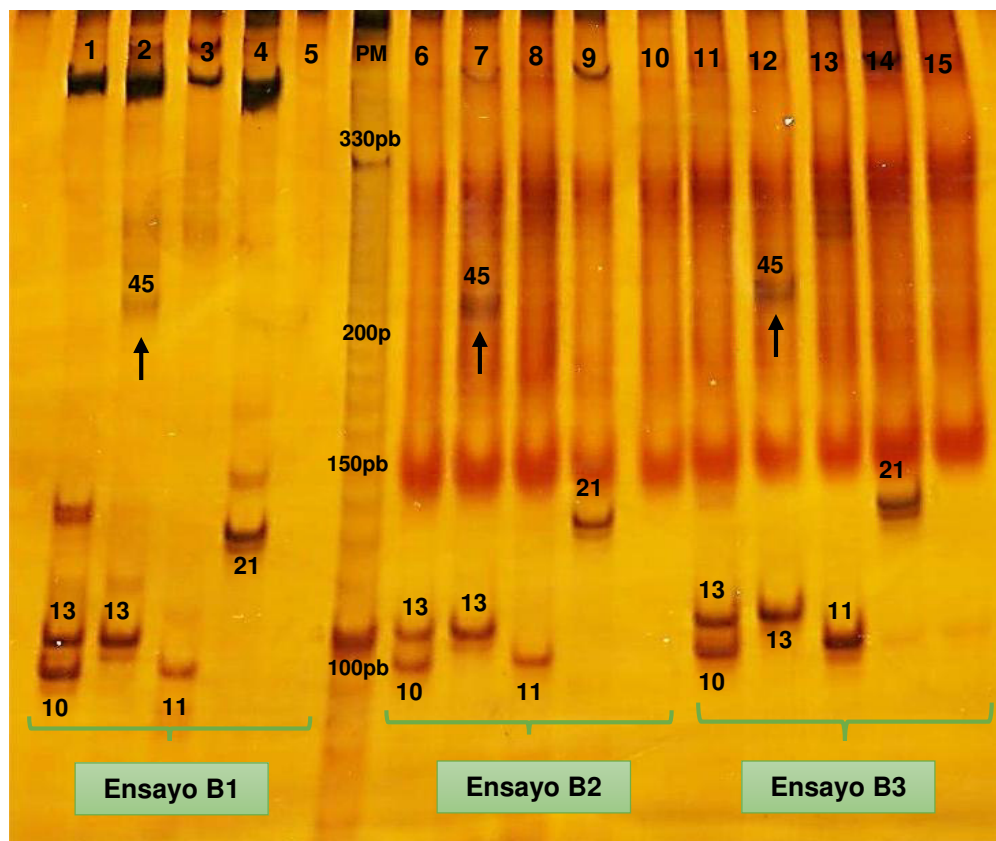
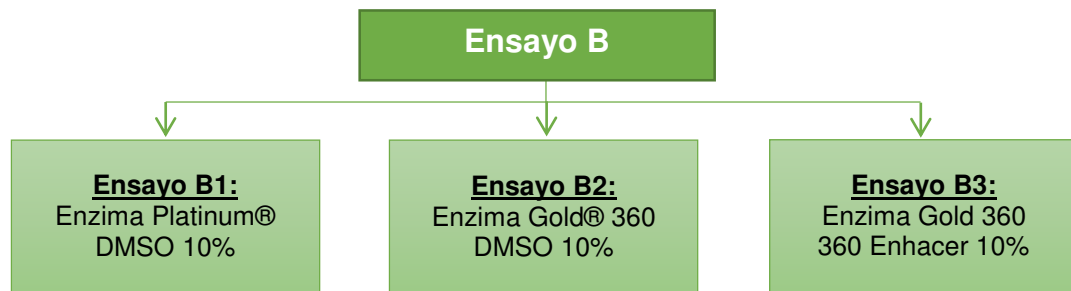
ANEXO 6. Variaciones al protocolo de amplificación por PCR convencional para genotipificar el alelo normal del gen *DMPK*.

ANEXO 6a: Ensayo A: Variación del programa de amplificación de PCR.



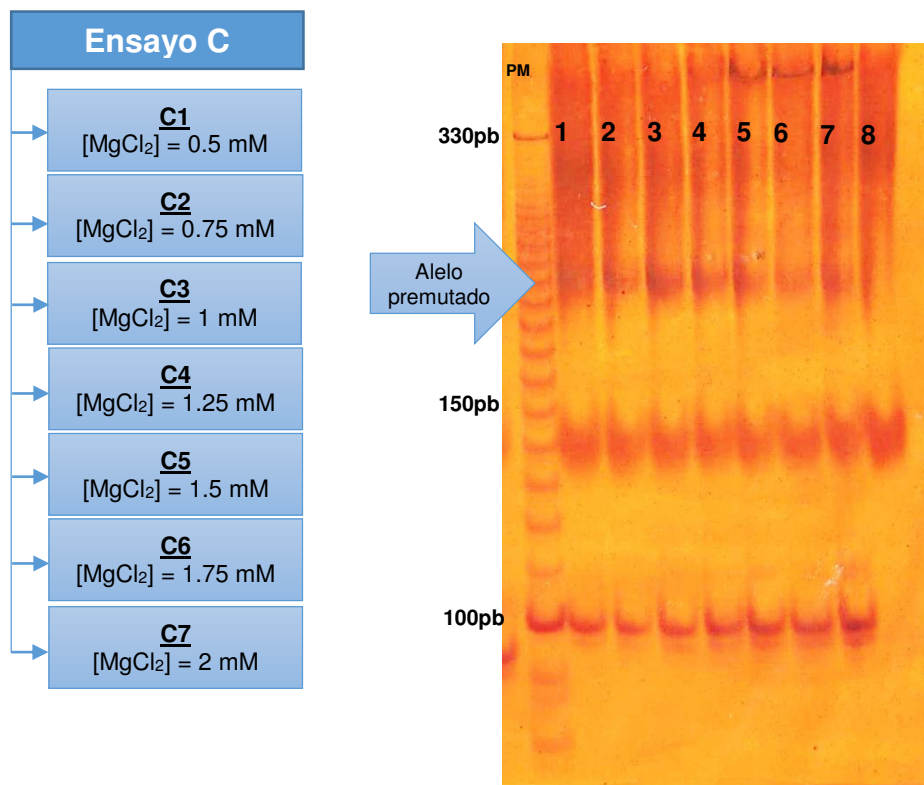
Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos por PCR convencional en el ensayo A. Fraccionamiento electroforético en gel de poliacrilamida no denaturante al 8%. En cada pocillo se cargó 1 µL del volumen de reacción. Carriles 1-5: Ensayo A2. Carriles 6-10: Ensayo A1. Carril 1 y 6: Muestra negativa para DM1 (11/13 CTG). Carril 2 y 7: Muestra de premutación (13/45 CTG). Carril 3, 4, 8 y 9: Muestra positiva para DM1 (10/>50 y 21/>50). Carril 5 y 10: blanco de amplificación (sin ADN). Carril PM: Marcador de peso molecular de 10 pb. La flecha indica el alelo premutado. Los resultados obtenidos con los programas de amplificación utilizados fueron similares. Se seleccionó el **ensayo A2** debido a que se reduce el tiempo de amplificación con respecto al inicial.

ANEXO 6b: Ensayo B: Variación del tipo de enzima polimerasa y coadyuvante.



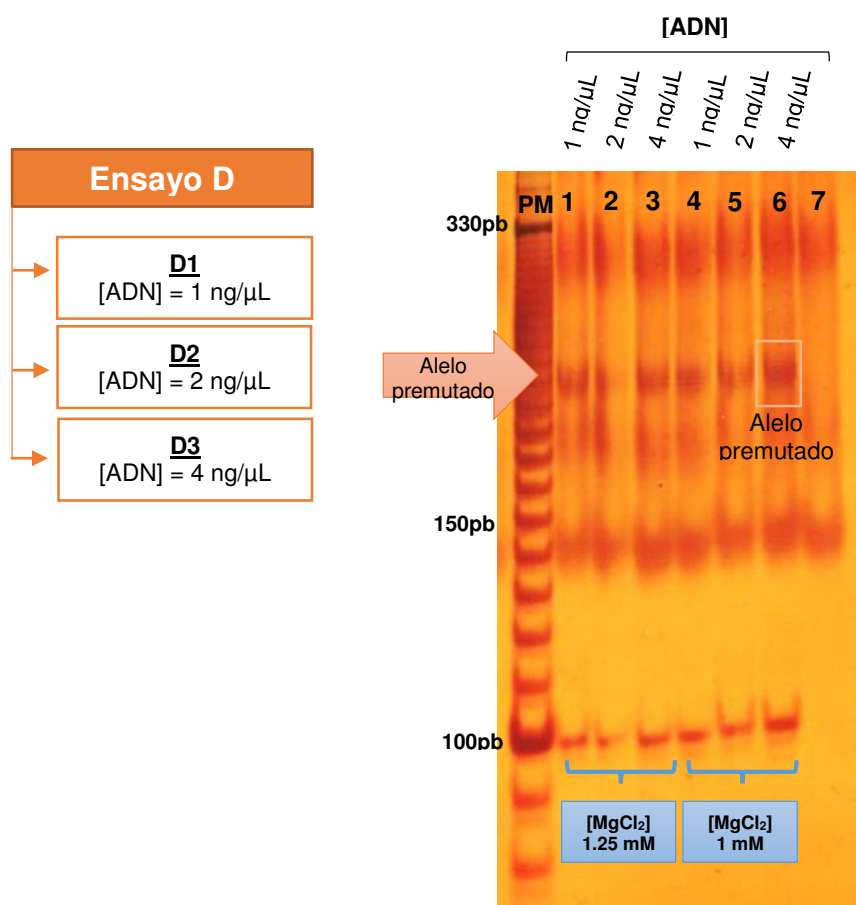
Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos por PCR convencional en el Ensayo B. Fraccionamiento electroforético en gel de poliacrilamida no denaturante al 8%. En cada pocillo se cargó 1 μ L del volumen de reacción. Carriles 1-5: Ensayo B1. Carriles 6-10: Ensayo B2. Carriles 11-15: Ensayo B3. Carril 1, 6 y 11: muestra negativa para DM1 (11/13 CTG). Carril 2, 7 y 12: muestra de premutación (13/45 CTG). Carril 3, 4, 8, 9, 13 y 14: muestra positiva para DM1 (10/>50 y 21/>50). Carril 5, 10 y 15: blanco de amplificación (sin ADN). Carril PM: marcador de peso molecular de 10 pb. A flecha indica el alelo premutado. El ensayo seleccionado fue el **B3** por presentar menor cantidad de patrón de bandas inespecíficas y mayor rendimiento que los otros ensayos, notándose claramente el alelo premutado.

ANEXO 6c- Ensayo C: Variación de la concentración de $MgCl_2$.



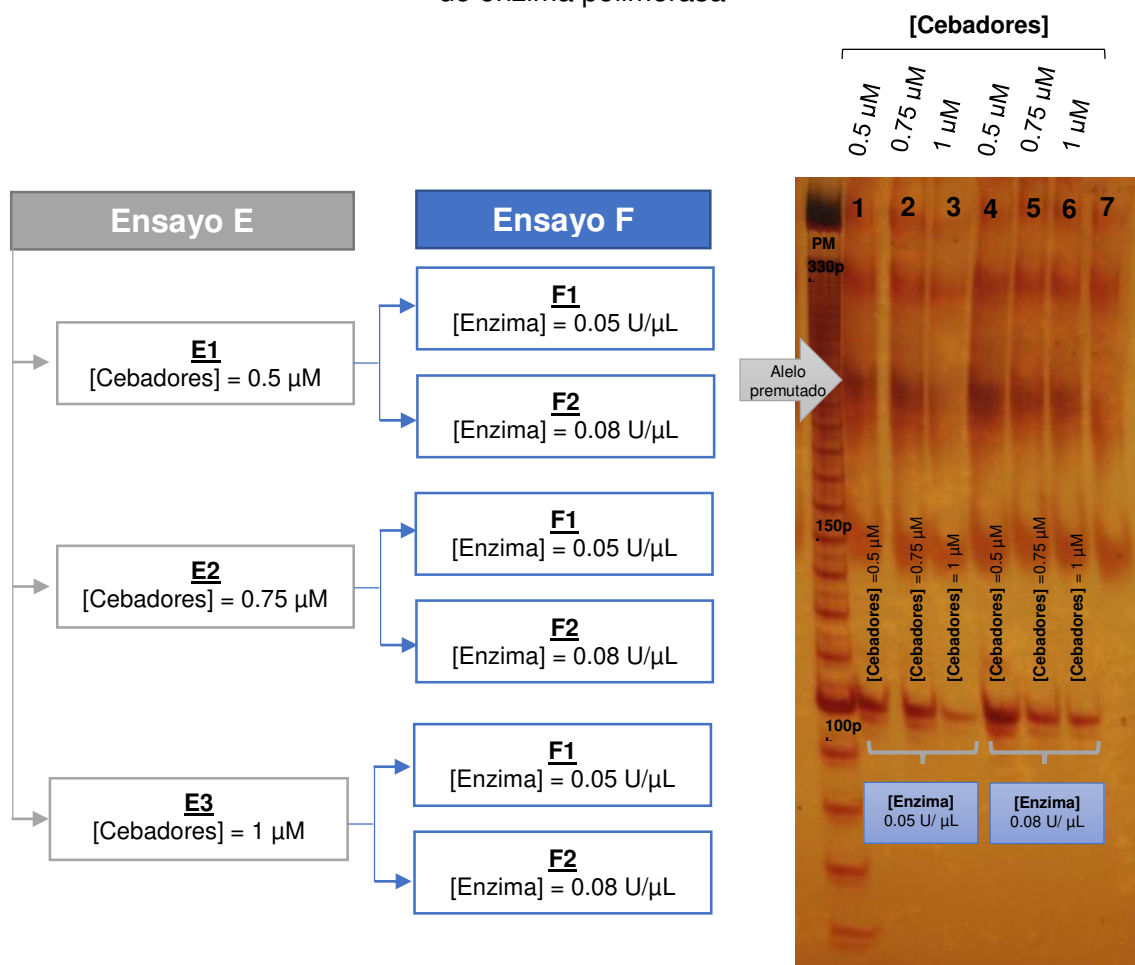
Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos por PCR convencional en el ensayo C. Fraccionamiento electroforético en gel de poliacrilamida no denaturante al 8%. En cada pocillo se cargó 1 μ L del volumen de reacción. Carriles 1-7: muestra de premutación (13/45 CTG). Carril 1: $[MgCl_2] = 0.5$ mM. Carril 2: $[MgCl_2] = 0.75$ mM. Carril 3: $[MgCl_2] = 1$ mM. Carril 4: $[MgCl_2] = 1.25$ mM. Carril 5: $[MgCl_2] = 1.5$ mM. Carril 6: $[MgCl_2] = 1.75$ mM. Carril 7: $[MgCl_2] = 2$ mM. Carril 8: blanco de amplificación (sin ADN). Carril PM: marcador de peso molecular de 10 pb. La flecha indica el alelo premutado. En la figura se puede observar el alelo en premutación poco definido empleando 0.5 mM, 1.5 mM, 1.75 mM y 2 mM de $MgCl_2$ (carriles 1, 5, 6 y 7, respectivamente). Se seleccionaron las dos mejores concentraciones de $MgCl_2$ para el alelo normal y el alelo premutado: 1 mM y 1.25 mM. La ausencia de bandas inespecíficas sobre los 330pb es notable a menores concentraciones de $MgCl_2$.

ANEXO 6d- Ensayo D: Variación de la concentración de ADN



Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos por PCR convencional en el ensayo D. Fraccionamiento electroforético en gel de poliacrilamida no denaturante al 8%. En cada pocillo se cargó 1 μL del volumen de reacción. Carriles 1-6: muestra de premutación (13/45 CTG). Carriles 1-3: [MgCl₂] = 1 mM. Carril 4-6: [MgCl₂] = 1.25 mM. Carril 1 y 4: [ADN] = 1 ng/μL. Carril 2 y 5: [ADN] = 2 ng/μL. Carril 3 y 6: [ADN] = 4 ng/μL. Carril 7: blanco de amplificación (sin ADN). Carril PM: marcador de peso molecular de 10 pb. La flecha indica el alelo premutado. En la figura se puede observar la mayor definición del alelo premutado empleando 1.25 mM de MgCl₂ y 4 ng/μL de ADN (carril 6: **ensayo D3**). Note que a menor concentración de ADN y MgCl₂, el alelo en premutación se torna más difuso.

ANEXO 6e- Ensayo E: Variación de la concentración de cebadores y concentración de enzima polimerasa



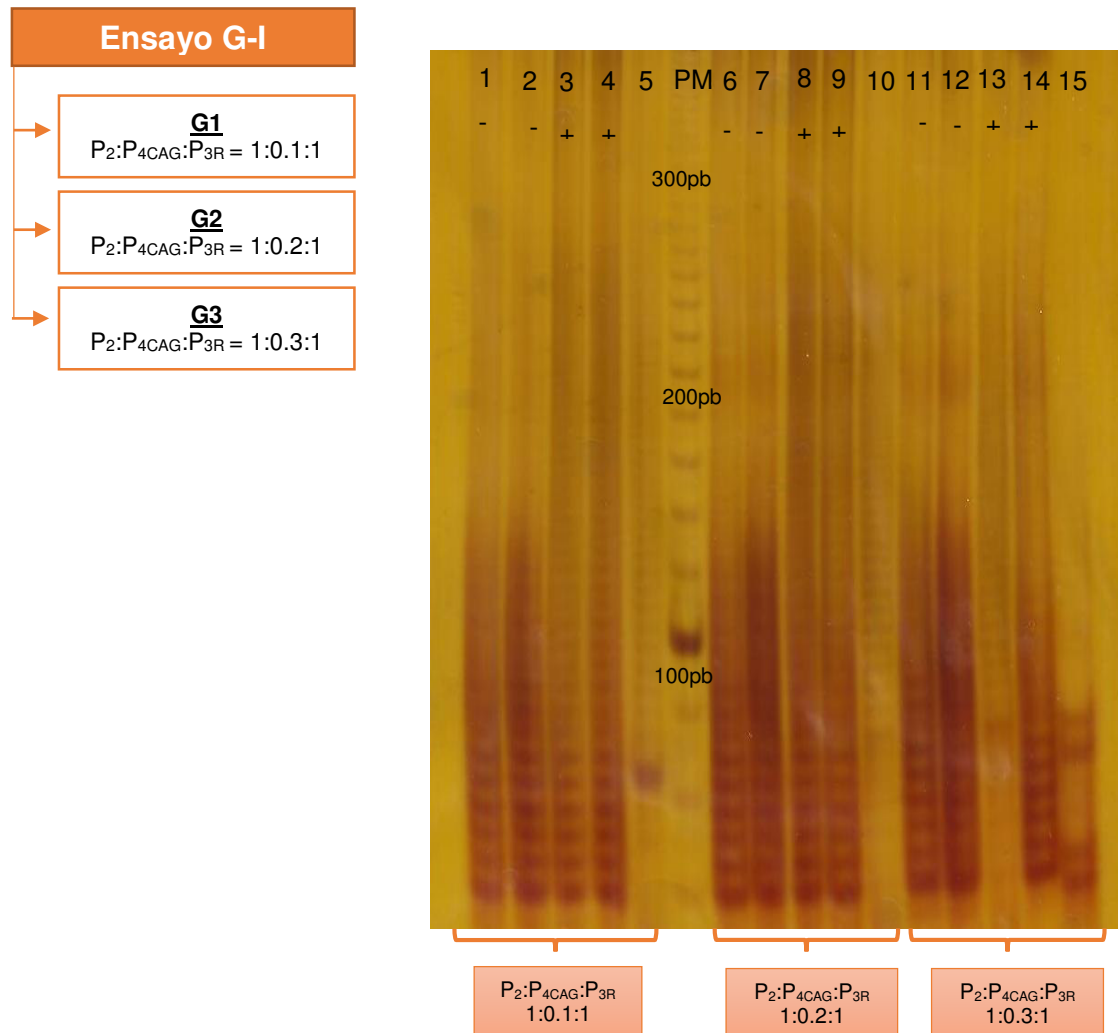
Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos por PCR convencional en el ensayo E y F. Fraccionamiento electroforético en gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 8%. En cada pocillo se cargó 1 μ L del volumen de reacción. Carriles 1-6: muestra de premutación (13/45 CTG). Carriles 1-3: [Enzima polimerasa] = 0.05 U/ μ L. Carril 4-6: [Enzima polimerasa] = 0.08 U/ μ L. Carril 1 y 4: [Cebadores] = 0.5 μ M. Carril 2 y 5: [Cebadores] = 0.75 μ M. Carril 3 y 6: [Cebadores] = 0.1 μ M. Carril 7: blanco de amplificación (sin ADN). Carril PM: marcador de peso molecular de 10 pb. La flecha indica el alelo premutado. Los ensayos seleccionados fueron **E2 y F2**.

ANEXO 7: Protocolo optimizado de PCR convencional para genotipificar el alelo normal del microsatélite CTG en el gen *DMPK*.

Reactivos	Volumen (μ L)	[] final
H2O	3.79	
360 GC Enhancer 100%	1	10%
Buffer 10X	1	1X
MgCl ₂ (25 mM)	0.5	1.25 mM
Mix dNTPs (2.5 mM c/u)	0.8	0.2 mM
P1 (20 μ M)	0.375	0.75 μ M
P2 (20 μ M)	0.375	0.75 μ M
AmplitaqGold® 360 (5 U/ μ L)	0.16	0.08 U/ μ L
ADN (20 ng/ μ L)	2	4 ng/ μ L
Volumen final	10	-

ANEXO 8. Variaciones al protocolo de amplificación por TP-PCR para la detección del alelo en rango patológico del gen *DMPK*.

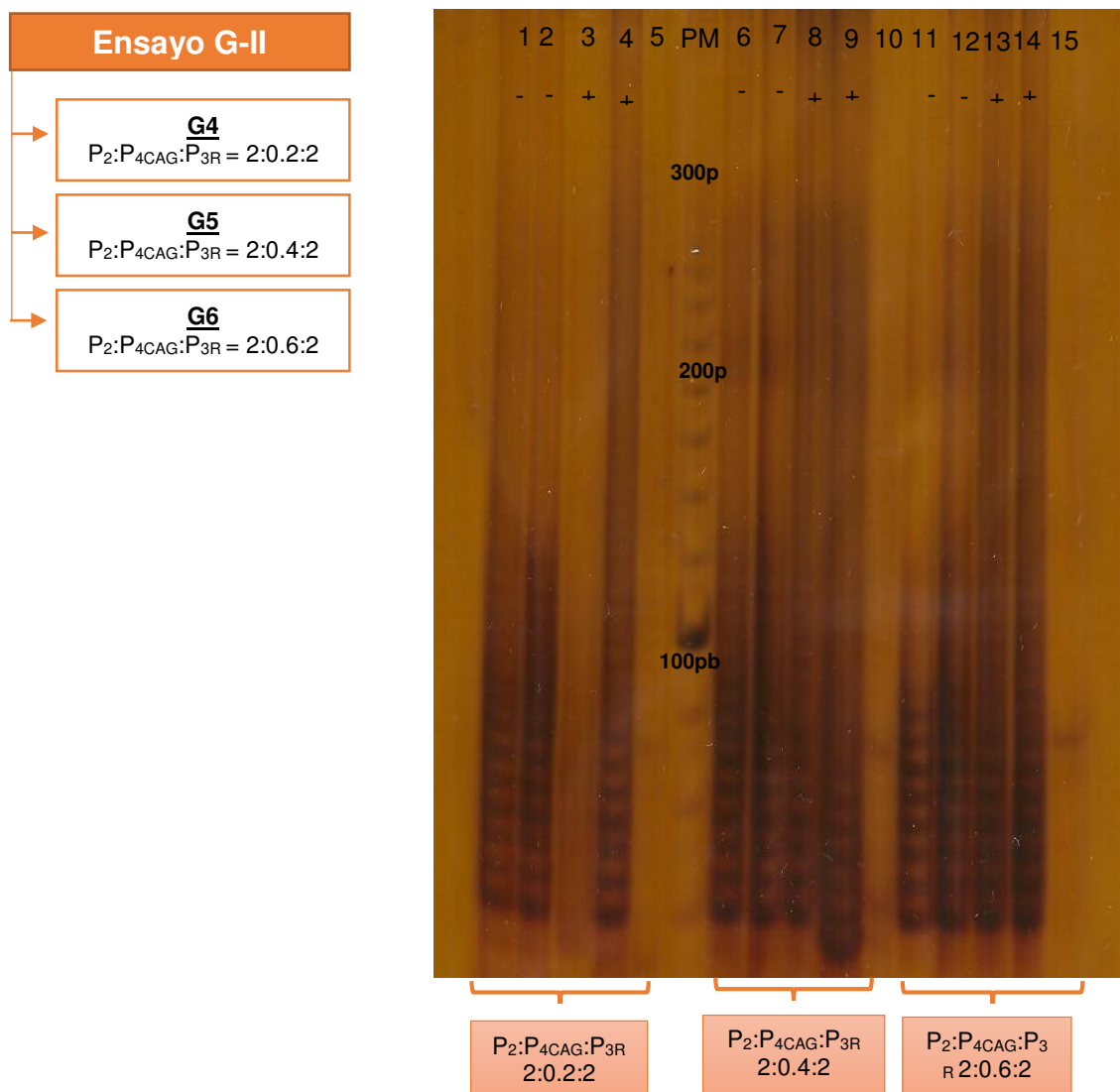
ANEXO 8a- Ensayo G-I: Variación en la concentración de cebadores I.



Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos por TP-PCR en el ensayo G-I.

Fraccionamiento electroforético en gel de poliacrilamida no denaturante al 8%. En cada pocillo se cargó 3 µL del volumen de reacción. Carriles 1-5: Ensayo G1. Carriles 6-10: Ensayo G2. Carriles 11-15: Ensayo G3. Carriles 3, 4, 8, 9, 13 y 14: muestras positivas para DM1. Carriles 1, 2, 6, 7, 11 y 12: muestras negativas para DM1. Carril 15: blanco de amplificación (sin ADN). Carril PM: marcador de peso molecular de 20 pb. Nótese el patrón de migración en escalera o smear (aspecto de mancha alargada) característicos de los productos de amplificación por TP-PCR. El ensayo seleccionado fue el **G2**.

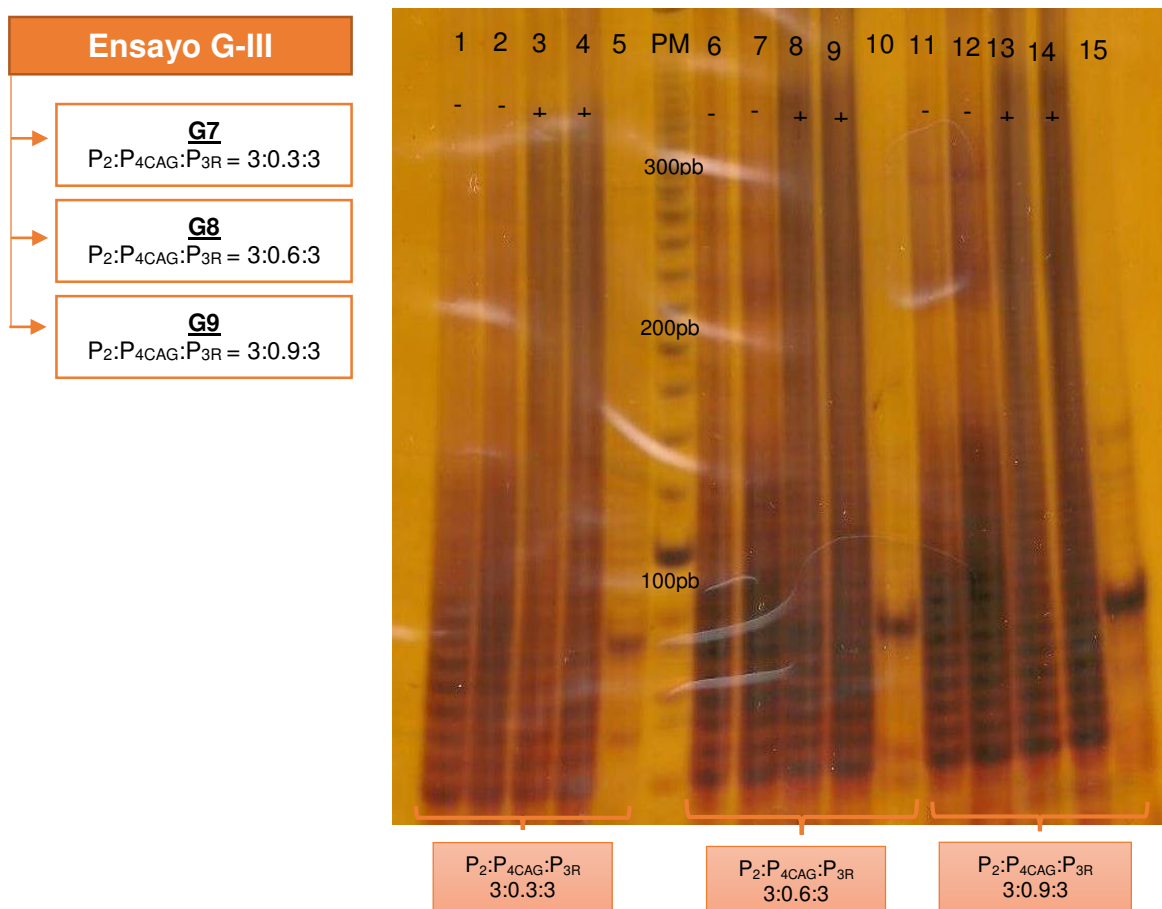
ANEXO 8b: Ensayo G-II: Variación en la concentración de cebadores II.



Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos por TP-PCR en el ensayo G-II.

Fraccionamiento electroforético en gel de poliacrilamida no denaturante al 8%. En cada pocillo se cargó 3 μ L del volumen de reacción. Carriles 1-5: Ensayo G4. Carriles 6-10: Ensayo G5. Carriles 11-15: Ensayo G6. Carriles 3, 4, 8, 9, 13 y 14: muestras positivas para DM1. Carriles 1, 2, 6, 7, 11 y 12: muestras negativas para DM1. Carril 15: blanco de amplificación (sin ADN). Carril PM: marcador de peso molecular de 20 pb. Nótese el patrón de migración en escalera o smear (aspecto de mancha alargada) característicos de los productos de amplificación por TP-PCR. El ensayo seleccionado fue el **G5**.

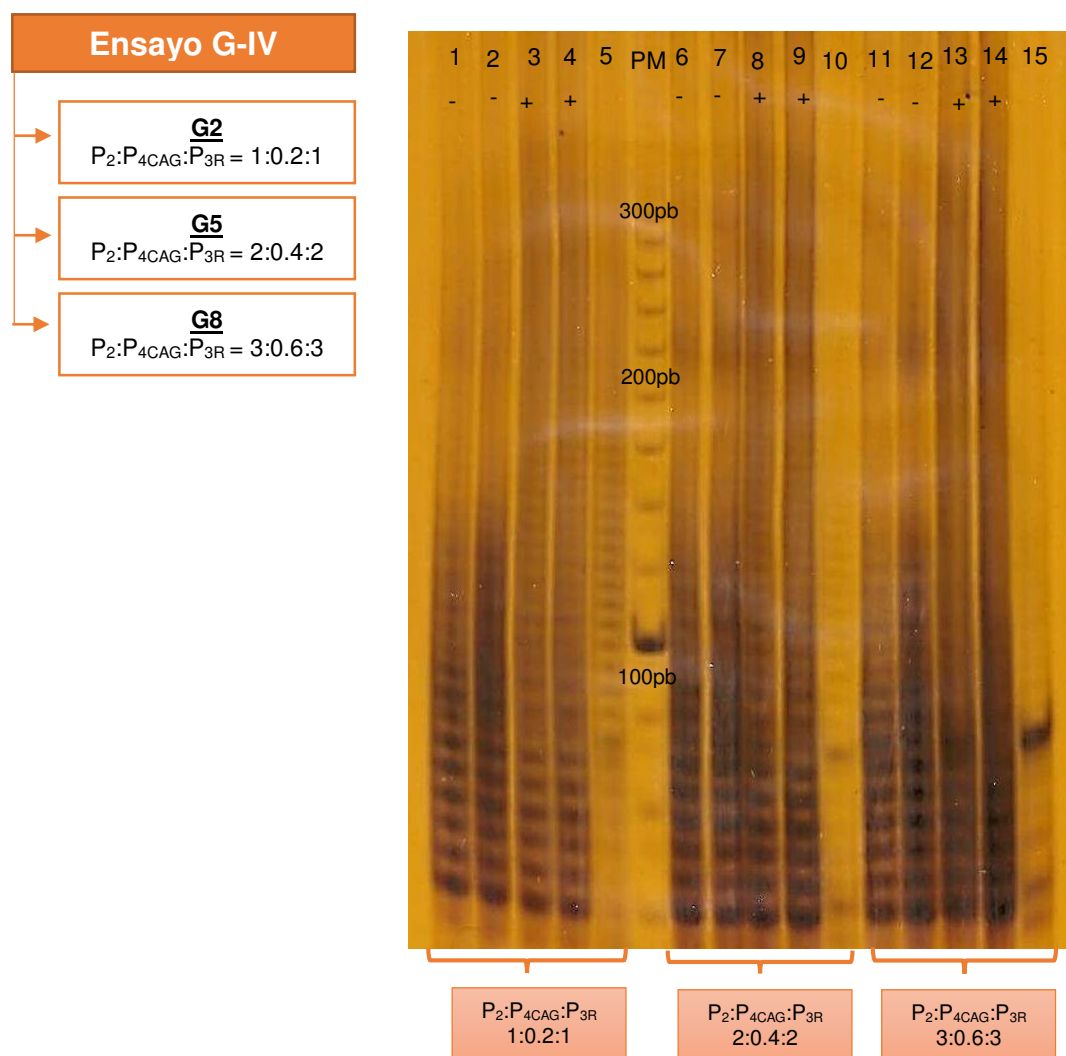
ANEXO 8c- Ensayo G-III: Variación en la concentración de cebadores III.



Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos por TP-PCR en el ensayo G.

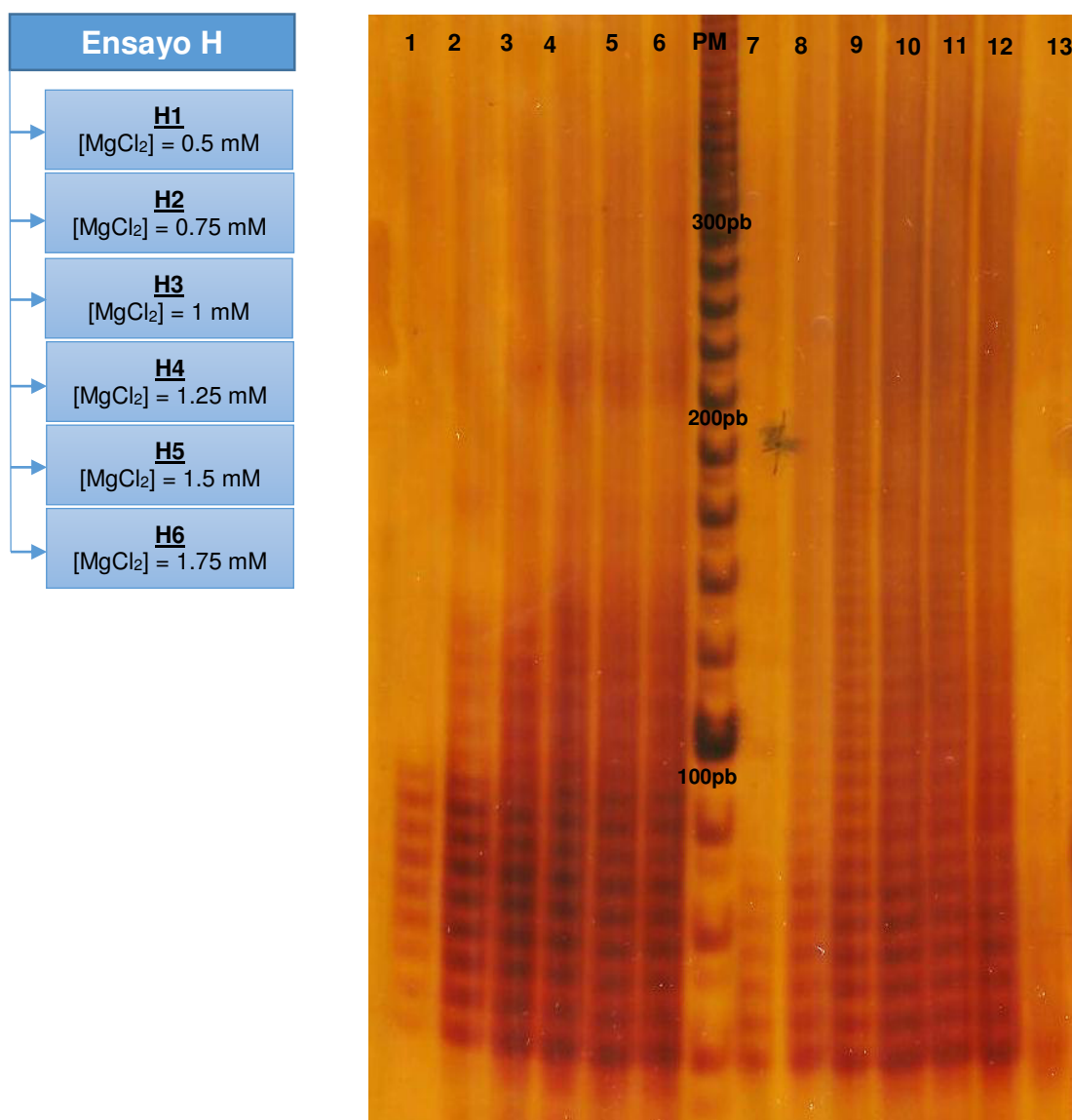
Fraccionamiento electroforético en gel de poliacrilamida no denaturante al 8%. En cada pocillo se cargó 3 μ L del volumen de reacción. Carriles 1-5: Ensayo G7. Carriles 6-10: Ensayo G8. Carriles 11-15: Ensayo G9. Carriles 3, 4, 8, 9, 13 y 14: muestras positivas para DM1. Carriles 1, 2, 6, 7, 11 y 12: muestras negativas para DM1. Carril 15: blanco de amplificación (sin ADN). Carril PM: marcador de peso molecular de 20 pb. Nótese el patrón de migración en escalera o smear (aspecto de mancha alargada) característicos de los productos de amplificación por TP-PCR. El ensayo seleccionado fue el **G8**.

ANEXO 8d- Ensayo G-IV: Comparación de los valores optimizados de los ensayos G-I, G-II y G-III



Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos por TP-PCR en el ensayo G-IV. Fraccionamiento electroforético en gel de poliacrilamida no denaturante al 8%. En cada pocillo se cargó 3 µL del volumen de reacción. Carriles 1-5: Ensayo G2. Carriles 6-10: Ensayo G5. Carriles 11-15: Ensayo G8. Carriles 3, 4, 8, 9, 13 y 14: muestras positivas para DM1. Carriles 1, 2, 6, 7, 11 y 12: muestras negativas para DM1. Carril 15: blanco de amplificación (sin ADN). Carril PM: marcador de peso molecular de 20 pb. Nótese el patrón de migración en escalera o smear (aspecto de mancha alargada) característicos de los productos de amplificación por TP-PCR. El ensayo seleccionado fue el **G5**.

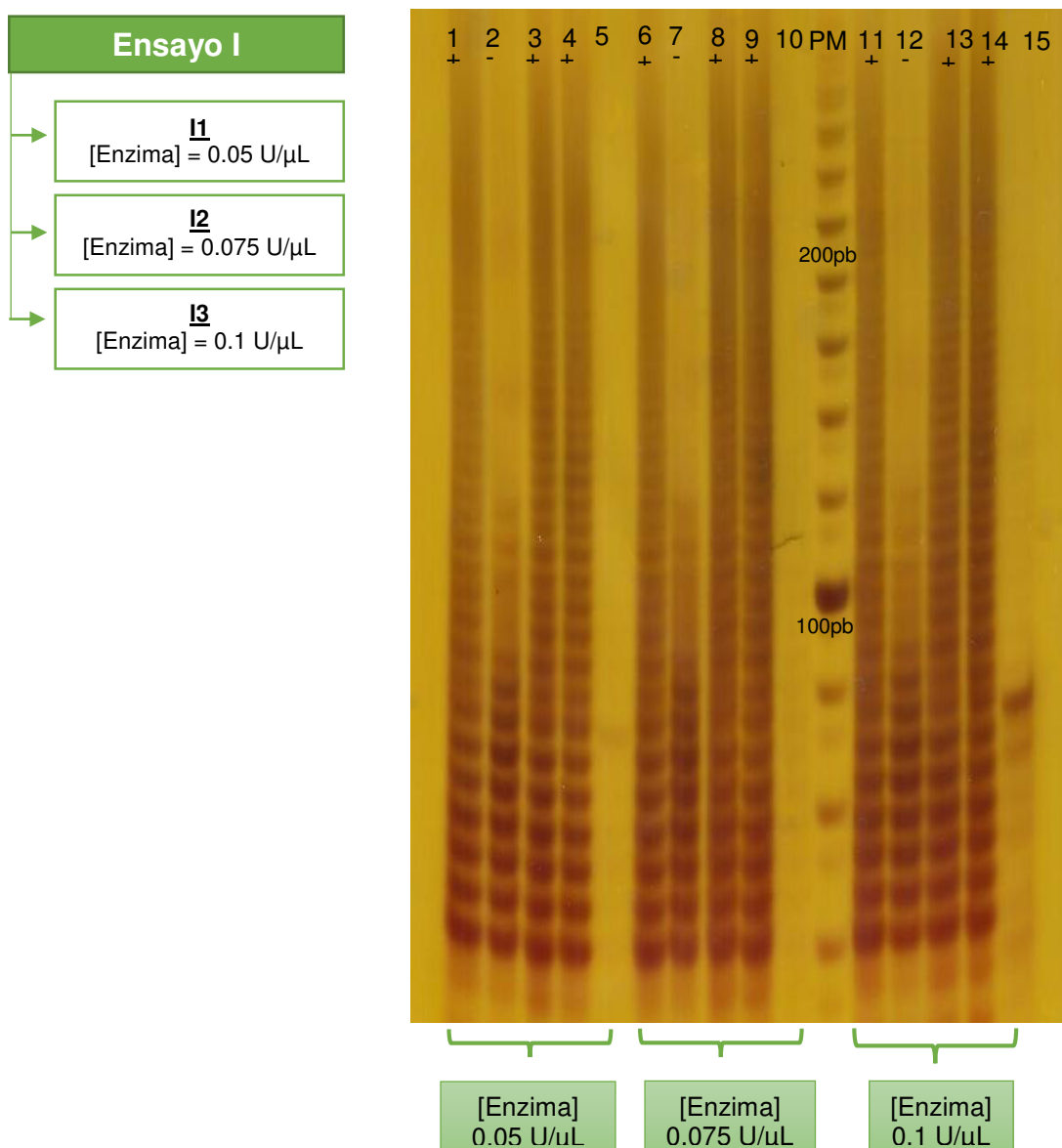
ANEXO 8e- Ensayo H: Variación en la concentración de MgCl_2 .



Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos por TP-PCR en el ensayo H.

Fraccionamiento electroforético en gel de poliacrilamida no denaturante al 8%. En cada pocillo se cargó 3 μL del volumen de reacción. Carriles 1-6: muestras negativas para DM1. Carriles 7-12: muestras positivas para DM1. Carril 1 y 7: [MgCl_2] = 0.5 mM. Carril 2 y 8: [MgCl_2] = 0.75 mM. Carril 3 y 9: [MgCl_2] = 1 mM. Carril 4 y 10: [MgCl_2] = 1.25 mM. Carril 5 y 11: [MgCl_2] = 1.5 mM. Carril 6 y 12: [MgCl_2] = 1.75 mM. Carril 13: blanco de amplificación (sin ADN). Carril PM: marcador de peso molecular de 20 pb. Nótese el patrón de migración en escalera o smear (aspecto de mancha alargada) característicos de los productos de amplificación por TP-PCR. El ensayo seleccionado fue el **H4** debido a que es notorio el patrón de bandas diferencial entre la muestra positiva y negativa para DM1.

ANEXO 8f- Ensayo I: Variación en la concentración de enzima polimerasa.



Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos por TP-PCR en el ensayo I.

Fraccionamiento electroforético en gel de poliacrilamida no denaturante al 8%. En cada pocillo se cargó 3 μL del volumen de reacción. Carriles 1-5: Ensayo I1. Carriles 6-10: Ensayo I2. Carriles 11-15: Ensayo I3. Carriles 2,7 y 12: muestras negativas para DM1. Carriles 1, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 13 y 14: muestras positivas para DM1. Carril 5, 10 y 15: blanco de amplificación (sin ADN). Carril PM: marcador de peso molecular de 20 pb. Nótese el patrón de migración en escalera o smear (aspecto de mancha alargada) característicos de los productos de amplificación por TP-PCR. El ensayo seleccionado fue el **I3** debido a que es notorio el patrón de bandas diferencial entre la muestra positiva y negativa para DM1.

ANEXO 9. Protocolo optimizado de TP-PCR para la detección del alelo expandido del microsatélite CTG en el gen *DMPK*.

Reactivos	Volumen (uL)	[] final
H ₂ O	3.4	
DMSO 100%	0.4	4%
Buffer 10X	1	1X
MgCl ₂ (25 mM)	0.5	1.25 mM
Mix dNTPs (2.5 mM c/u)	1	0.25 mM
P2 (40 μM)	0.5	2 μM
P4CAG (8 μM)	0.5	0.4 μM
P3R (40 μM)	0.5	2 μM
Long PCR enzyme (5 U/μL)	0.2	0.1 U/μL
ADN (20 ng/μL)	2	4 ng/μL
Volumen final	10	-